

Uniwersytet Warszawski

Wydział Biologii



Agata Kodroń

Nr albumu: 277023

# Podłoże molekularne dziedzicznej neuropatii wzrokowej Lebera

Rozprawa doktorska  
w zakresie nauk biologicznych  
dyscyplinie biologii

Praca wykonana pod kierunkiem

**Prof. dr hab. Ewy Bartnik**

Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii  
Uniwersytet Warszawski

Warszawa, kwiecień 2015

### *Oświadczenie kierującego pracą*

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biologii.

Data

Podpis kierującego pracą

### *Oświadczenie autora pracy*

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia doktora w innej jednostce.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data

Podpis autora pracy

### **Słowa kluczowe**

Leber's Hereditary Optic Neuropathy, LHON, Dziedziczna neuropatia wzrokowa Lebera, mitochondria, mtDNA, apoptoza, autofagia

### **Tytuł pracy w języku angielskim**

The molecular basis of Leber's hereditary optic neuropathy

Podczas wykonywania niniejszej pracy zostały wykorzystane środki finansowe przyznane przez Narodowe Centrum Nauki (grant PRELUDIUM 2011/03/N/NZ3/00655).

Dziękuję wymienionej instytucji.

## **Podziękowania**

Serdecznie dziękuję Pani profesor dr hab. Ewie Bartnik za umożliwienie mi wykonania pracy w jej grupie badawczej. Dziękuję za wieloletnią opiekę, cenne rady, przekazaną wiedzę, a także za umożliwienie mi realizacji własnych pomysłów, pomoc w trakcie powstawania tej pracy i ogromne wsparcie w dążeniu do rozwoju naukowego.

Doktor hab. Katarzynie Tońskiej dziękuję za wsparcie naukowe i wartościowe rady, a także za stworzenie wspianiałej atmosfery do pracy naukowej.

Profesorowi dr hab. Krzysztofowi Zabłockiemu dziękuję za możliwość wykonania eksperymentów w jego laboratorium, cenne rady, rozmowy i pomysły.

Dziękuję dr Dorocie Dymkowskiej oraz doktorantom Pracowni Metabolizmu Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego za opiekę i życzliwość podczas wykonywania eksperymentów.

Wszystkim studentom, doktorantom i pracownikom Instytut Genetyki i Biotechnologii dziękuję za miłą atmosferę pracy i życzliwość.

Koleżankom i kolegom z pokoju 139 i 133 i 136 dziękuję za wspólnie spędzony czas na rozmowach nie tylko naukowych oraz za możliwość korzystania z ich wiedzy i doświadczenia.

Studentkom, którymi miałam przyjemność się opiekować: Klaudii Karwowskiej, Agacie Kulickiej, Dianie Senator, Magdzie Ghanim, Katarzynie Jóźwiak i Zuzannie Staszczak dziękuję za wspianiałą współpracę, pomoc w wykonywaniu niektórych eksperymentów i mile spędzony czas.

Szczególnie dziękuję dr Aleksandrze Sołydze-Żurek, dr Aleksandrze Maruszak i dr Michalinie Kosiorek za cenne porady i wsparcie duchowe w trakcie pisania tej pracy oraz przyjaźń, dzięki której szybciej udało mi się zaaklimatyzować do życia w Warszawie.

**Pracę dedykuję moim rodzicom, którzy zawsze wspierali mnie w dążeniu do pogłębiania wiedzy. Nie ma słów, które pozwoliłyby mi wyrazić jak bardzo jestem im wdzięczna.**

## Spis treści

<b>Streszczenie</b> .....	10
<b>Summary</b> .....	11
<b>Stosowane skróty</b> .....	12
<b>Publikacje</b> .....	16
<b>1. WSTĘP</b> .....	17
1.1 Mitochondria.....	17
1.1.2 Mitochondrialny łańcuch oddechowy.....	19
1.1.3 Komplex I mitochondrialnego łańcucha oddechowego .....	20
1.2 Zaburzenia mitochondrialne w patogenezie chorób człowieka.....	21
1.2.1 Choroby mitochondrialne .....	21
1.2.2 Zaburzenia mitochondrialne w tkance nerwowej .....	22
1.3. Dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera .....	23
1.3.1 Tło historyczne .....	23
1.3.2 Podłoże genetyczne choroby .....	23
1.3.2.1 Mutacje mitochondrialnego DNA .....	23
1.3.2.2 Mutacje podstawowe odpowiedzialne za ekspresję fenotypową LHON.....	24
1.3.2.3 Mutacje rzadkie i kandydujące do LHON .....	25
1.3.2.4 Mutacje podwójne u pacjentów z LHON .....	25
1.3.3 Obraz kliniczny LHON.....	26
1.3.4 Rokowania dotyczące możliwości ustąpienia objawów zaniku wzroku w LHON .....	28
1.3.5 Zespół LHON plus.....	29
1.3.6 Epidemiologia LHON.....	29
1.3.7 Czynniki przyczyniające się do ekspresji choroby .....	29
1.3.7.1 Czynniki anatomiczne.....	30
1.3.7.2 Czynniki hormonalne.....	32

1.3.7.3 Czynniki genetyczne.....	33
1.3.7.4 Czynniki środowiskowe.....	34
1.3.8 Metody leczenia LHON.....	34
1.3.9 Zanik nerwu wzrokowego w LHON i innych chorobach mitochondrialnych.....	35
1.4 Hipotezy dotyczące mechanizmu śmierci komórek zwojowych siatkówki .....	35
1.4.1 Zaburzenia kompleksu I łańcucha oddechowego w komórkach z mutacjami LHON ....	36
1.4.2 Stres oksydacyjny .....	36
1.4.3 Apoptoza.....	37
1.4.3.1 Apoptoza zależna od kaspaz .....	38
1.4.3.2 Apoptoza zależna od PARP-1/AIF .....	39
1.4.4 Apoptoza w LHON .....	40
1.4.5 Autofagia .....	41
1.4.6 Autofagia w LHON .....	44
1.5. Modele komórkowe chorób mitochondrialnych.....	46
<b>2. CELE PRACY.....</b>	<b>49</b>
<b>3. MATERIAŁY I METODY .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1 MATERIAŁY.....</b>	<b>50</b>
3.1.1 Pacjenci i ich charakterystyka.....	50
3.1.2 Charakterystyka grupy kontrolnej .....	52
3.1.3 Stosowane linie komórkowe .....	53
3.1.4 Warunki hodowli .....	54
<b>3.2 METODY .....</b>	<b>56</b>
3.2.1 Wyprowadzanie linii komórkowych.....	56
3.2.2 Izolacja całkowitego DNA.....	62
3.2.3 Procedury detekcji mutacji LHON .....	63
3.2.4 Sekwencjonowanie .....	66
3.2.5 Detekcja mutacji u członków rodzin probandów .....	66

3.2.6 Ocena poziomu heteroplazmii zidentyfikowanych mutacji.....	66
3.2.7 Analizy genetyczne transmitochondrialnych hybryd cytoplazmatycznych (cybryd) .....	71
3.2.8 Analiza haplogrup mitochondrialnych pacjentów z LHON .....	76
3.2.9 Analizy hodowli komórkowych.....	77
3.2.9.1 Hodowla komórek.....	77
3.2.9.2 Analiza apoptozy .....	78
3.2.9.3 Analiza autofagii.....	82
3.2.9.4 Analiza produkcji wolnych rodników tlenowych .....	84
3.2.9.5 Analiza obecności transkryptów genów mitochondrialnych z mutacjami LHON .....	85
3.2.9.6 Analiza oddychania komórkowego .....	87
3.2.10 Obliczenia statystyczne.....	88
<b>4. WYNIKI .....</b>	<b>89</b>
4.1 Poszukiwanie rzadkich mutacji mtDNA prowadzących do zaniku nerwu wzrokowego ...	89
4.2 Wyprowadzenie linii komórkowych od pacjentów z m.11778G>A i m.3460G>A oraz od osób bez mutacji mitochondrialnych: linie limfoblastów, fibroblastów i hybryd transmitochondrialnych (cybryd).....	94
4.4 Analiza zmienności poziomu heteroplazmii m.11778G>A oraz m.3460G>A we krwi w czasie.....	104
4.5 Analiza poziomów transkryptów z genów mitochondrialnych <i>ND1</i> i <i>ND4</i> w liniach komórkowych z mutacjami LHON.....	105
4.6 Analiza produkcji wolnych rodników tlenowych .....	108
4.7 Analiza oddychania komórkowego .....	115
4.8 Analiza apoptozy w różnych liniach komórkowych.....	122
4.9 Badanie wpływu mutacji LHON na przebieg procesu autofagii .....	144
<b>5. DYSKUSJA .....</b>	<b>157</b>
5.1 Ocena zastosowanych linii komórkowych do analizy wpływu mutacji mitochondrialnych na metabolizm komórkowy .....	157
5.2 Rzadkie mutacje mitochondrialne odpowiedzialne za wystąpienie LHON .....	159



5.3 Analiza poziomu heteroplazmii mutacji mitochondrialnych w różnych typach komórek pacjentów z zanikiem nerwu wzrokowego .....	162
5.4 Stres oksydacyjny w komórkach z mutacjami LHON.....	164
5.5 Analiza wpływu zmiennego poziomu mutacji mitochondrialnych i specyficzności komórkowej na zdolność rotenonu do hamowania oksydoreduktazy NADH-Q .....	165
5.6 Mechanizmy kompensacyjne produkcji ATP w różnych komórkach z mutacjami LHON .....	167
5.7 Analiza wpływu poziomu heteroplazmii mutacji wywołujących LHON na metabolizm różnych komórek .....	170
5.8 Korelacje genotyp-czynniki środowiska-fenotyp w LHON .....	172
5.9 Analiza udziału aktywacji kaspaz i PARP-1 w pośredniczeniu w procesie apoptozy w komórkach z mutacjami LHON.....	172
5.10 Analiza wpływu mutacji LHON na indukcję i prawidłowy przebieg procesu autofagii	177
<b>PODSUMOWANIE .....</b>	<b>181</b>
<b>LITERATURA.....</b>	<b>183</b>
<b>Suplement 1 .....</b>	<b>198</b>
<b>Suplement 2 .....</b>	<b>201</b>
<b>Suplement 3 .....</b>	<b>205</b>
<b>Suplement 4 .....</b>	<b>209</b>

## Streszczenie

Mitochondria to organelle komórkowe odpowiedzialne za produkcję energii podczas oddychania komórkowego. Zawierają one własny, kolisty DNA długości około 16569pz.

Choroby mitochondrialne są zróżnicowaną grupą wieloukładowych zaburzeń wynikających z dysfunkcyjnej fosforylacji oksydacyjnej spowodowanej mutacjami w jądrowym lub mitochondrialnym DNA (mtDNA).

Dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera (LHON) jest najczęstszą chorobą mitochondrialną. Charakteryzuje się nagłą, bezbolesną utratą wzroku związaną z zaburzeniami nerwu wzrokowego. Mężczyźni chorują dużo częściej od kobiet (około 50% mężczyzn z mutacją i około 10% kobiet). Choroba w 96% przypadków jest spowodowana przez jedną z trzech mutacji w genomie mitochondrialnym: m.11778G>A, m.3460G>A lub m.14484T>C. Współwystępowanie dwóch mutacji patogennych odpowiedzialnych za LHON jest bardzo rzadkie, jednakże w 2008 roku w Instytucie Genetyki i Biotechnologii, w DNA wyizolowanym od kobiety i sześciorga jej dzieci zidentyfikowano kombinację dwóch mutacji m.11778G>A i m.3460G>A.

Przyczyna specyficznej neurodegeneracji tylko nerwu wzrokowego nie jest jasna. Istnieją hipotezy, że mutacje LHON powodują zaburzenia bioenergetyczne w komórkach pacjentów z LHON albo, że mitochondria pacjentów z LHON produkują więcej reaktywnych form tlenu (ROS). Jedną z najczęstszych hipotez jest taka, że mutacje w mtDNA zwiększają poziom apoptozy w tkance nerwu wzrokowego, jednak inne rodzaje śmierci komórkowej także mogą być zaangażowane, na przykład autofagia.

Głównym celem niniejszej pracy była charakterystyka patogenności mutacji LHON w liniach komórkowych wyprowadzonych od pacjentów i kontroli. Innym celem było poszukiwanie nowych mutacji odpowiedzialnych za tę chorobę.

Eksperymenty przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej pozwoliły na wykazanie, że mutacje LHON mogą modulować metabolizm innych komórek niż komórki nerwu wzrokowego, a istotnym parametrem wpływającym na intensywność różnych zmian metabolicznych w analizowanych komórkach (apoptoza, autofagia, produkcja ROS, aktywacja systemów kompensujących ATP, zdolność do wiązania rotenonu) jest rodzaj i poziom heteroplazmii mutacji.

Podczas badań zidentyfikowano także dwie rzadkie mutacje m.3635G>A i m.13042G>A u polskich pacjentów z objawami LHON.

## Summary

Mitochondria are cellular organelles responsible for energy production during cellular respiration. They contain their own circular DNA of about 16569bp.

Mitochondrial diseases are a heterogeneous group of multi-system disorders resulting from impaired oxidative phosphorylation, which may result from mutations either in nuclear genes or in mitochondrial DNA (mtDNA).

Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON) is the most common mitochondrial disease. LHON is characterized by sudden, painless loss of vision associated with abnormalities of the optic nerve. Men are affected more often than women (about 50% of men with the mutation, and approximately 10% of women). The disease in 96% of cases is caused by one of three mutations in the mitochondrial genome: m.11778G>A, m.3460G>A or m.14484T>C. The co-occurrence of two pathogenic mutations responsible for LHON is extremely rare, however, in 2008 in the Institute of Genetics and Biotechnology, in the DNA collected from a woman and her six children, a combination of mutation m.11778G>A and m.3460G>A was found.

The reasons for the specificity of neurodegeneration have not been clear. There are hypotheses that LHON mutations cause bioenergetic defects in cells of LHON patients or that LHON mitochondria produce more reactive oxygen species (ROS). One of the most common hypotheses is that mtDNA mutations increase the level of apoptosis in this tissue, however, other types of cell death could be also involved, for example autophagy.

The main objective of the project was the characterization of pathogenicity of LHON mutations in cell lines derived patients and controls. An other goal was to find new mutations responsible for this disease.

The experiments performed in the framework of this Ph.D. dissertation have shown that LHON mutations can modulate the metabolism of the cells other than the cells of the optic nerve, and an important parameter influencing the intensity of the various metabolic changes in the analyzed cells (apoptosis, autophagy, ROS production, activation of ATP compensation systems, the ability to bind rotenone) is the type and the heteroplasmy level of the mutations.

During the study, two rare mutations m.3635G>A and m.13042G>A in Polish patients with LHON symptoms, were also identified.

## STOSOWANE SKRÓTY

**ADOA** - zanik nerwu wzrokowego dziedziczony autosomalnie dominująco, zanik nerwów wzrokowych typu Kjera (ang. *autosomal dominant optic atrophy*)

**AIF** - czynnik indukujący apoptozę (ang. *apoptosis inducing factor*)

**ALS** - stwardnienie zanikowe boczne (ang. *amyotrophic lateral sclerosis*)

**APAF-1** - białko APAF-1 (ang. *apoptotic protease-activating factor 1*)

**Atg** – geny powiązane z autofagią (ang. *autophagy related genes*)

**ATP** - adenozy-5'-trifosforan (ang. *adenosine triphosphate*)

**BSA** - surowicza albumina wołowa (ang. *bovine serum albumin*)

**CAPS** - kwas 3-(cykloheksyloamino)-1-propanosulfonowy

**cccp** - karbonylocyjanek 3-chlorofenylohydrazonu (ang. *carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone*)

**CMA** - autofagia z udziałem białek opiekuńczych (ang. *chaperone-mediated autophagy*)

**CODIS** - system markerów STR (ang. *Combined DNA Index System*)

**DAPI** - dwuchlorowodorek 4,6-diamidyno-2-fenyloindolu (ang. *4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride*)

**dATP** - trifosforan deoksyadenozyny

**DEPC** - pirowęglan dietylu (ang. *diethyl pyrocarbonate*)

**D-loop** - pętla D (ang. *displacement loop*)

**DMSO** - dimetylosulfotlenek (ang. *dimethyl sulfoxide*)

**DNA** - kwas deoksyrybonukleinowy

**EtBr** - bromek etydyny

**6-FAM** - 6-karboksyfluoresceina

**FasL** - receptorowe białko powierzchniowe (ang. *Fas ligand*)

**FBS** - płodowa surowica bydlęca (ang. *foetal bovine serum*)

**FITC** - izotiocyanian fluoresceiny (ang. *fluorescein isothiocyanate*)

**FMN** - mononukleotyd flawinowy

**HEX** - heksachloro-6-karboksyfluoresceina

**HRP** - peroksydaza chrzanowa (ang. *horseradish peroxidase*)

**iPSC** - indukowane komórki pluripotencjalne (ang. *induced pluripotent stem cells*)

**IVF** - zapłodnienie pozaustrojowe (ang. *in vitro fertilisation*)

**kDa** -  $10^3$  Daltonów

**LHON** - Dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera (ang. *Leber's hereditary optic neuropathy*)

**MAP1-LC3 (LC3)** - lekki łańcuch 3 białek związanych z mikrotubulami 1A/1B (ang. *microtubule-associated protein light 1 chain 3*)

**MELAS** - miopatia mitochondrialna, encefalopatia, kwasica mleczanowa, występowanie incydentów podobnych do udarów (ang. *mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*)

**MERRF** - padaczka miokloniczna z czerwonymi poszarpanymi włóknami (ang. *myoclonic epilepsy with ragged red fibers*)

**EBV** - wirus Epsteina-Barr (ang. *Epstein-Barr virus*)

**mtDNA** - mitochondrialny DNA

**mTOR** - ssaczy cel rapamycyny (ang. *mammalian target of rapamycin*)

**mTORC1** - kompleks 1 kinazy mTOR (ang. *mammalian Target of Rapamycin Complex 1*)

**NAD<sup>+</sup>** - forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego

**NADH** - forma zredukowana dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego

**NARP** - neurogenna miopatia z ataksją i zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki (ang. *neurogenic myopathy, ataxia, retinitis pigmentosa*)

**ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6** - geny kodujące podjednostki dehydrogenazy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. *NADH dehydrogenase subunits*)

**NT2** - komórki neuronalne linii Ntera2/D1

**OMIM** - baza danych o wszystkich opisanych chorobach uwarunkowanych genetycznie występujących u człowieka (ang. *Online Mendelian Inheritance in Man*)

**OXPHOS** - fosforylacja oksydacyjna (ang. *oxidative phosphorylation*)

**PARP- 1** - polimeraza poli(ADP-rybozy)-1

**PBS** - zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. *phosphate-buffered saline*)

**PCR** - łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)

**PE**- fosfatydyloetanoloamina (ang. *phosphatidylethanolamine*)

**PEG** - glikol polietylenowy

**pz** - para zasad

**RFLP** - polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

**RGC** - komórki zwojowe siatkówki (ang. *retinal ganglion cells*)

**RNA** - kwas rybonukleinowy

**ROS** - reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

**rpm** - obroty na minutę (ang. *revolutions per minute*)

**RT** - temperatura pokojowa (ang. *room temperature*)

**SDS-PAGE** - elektroforeza w żelu poliakryloamidowym z dodatkiem siarczanu dodecyłu sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

**SDS** - siarczan dodecyłu sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate*)

**SOD2** - dysmutaza ponadtlenkowa 2 (ang. *superoxide dismutase 2*)

**STR** - krótkie powtórzenia tandemowe (ang. *short tandem repeats*)

**TK** - kinaza tymidynowa

**TNF $\alpha$**  - czynnik martwicy guza (ang. *tumor necrosis factor alpha*)

**TRAIL** - ligand czynnika martwicy guza indukujący apoptozę (ang. *tumor necrosis factor related - apoptosis inducing - ligand*)

**UV**- światło ultrafioletowe

**v/v** - procentowe stężenie objętościowe (ang. *volume/volume*)

**w/v** - procentowe stężenie wagowo/objętościowe (ang. *weight/volume*)

## PUBLIKACJE

Część wyników przedstawionych w rozprawie doktorskiej opublikowano w pracach:

1. Tońska K., Kodroń A., Bartnik E. *Genotype - phenotype correlations in Leber hereditary optic neuropathy*. Biochimica et Biophysica Acta 1797 (6-7): 1119–1123, 2010
2. Sławek J., Kierdaszuk B., Tońska K., Kodroń A., Schinwelski M., Sitek E.J., Bartnik E., Kamińska A., Kwieciński H. *Mitochondrial encephalopathy in a patient with a 13042G>A de novo mutation*. The Journal of Clinical Pathology 65 (12): 1147-1149, 2012
3. Kodroń A., Krawczyński M.R., Tońska K., Bartnik E. *m.3635G>A mutation as a cause of Leber hereditary optic neuropathy*. The Journal of Clinical Pathology 67 (7): 639-641, 2014
4. Schinwelski M., Kierdaszuk B., Dulski J., Tońska K., Kodroń A., Sitek E.J., Bartnik E., Kamińska A., Kwieciński H., Sławek J. *Changing phenotypic expression in a patient with a mitochondrial encephalopathy due to 13042G>A de novo mutation – a 5 year follow up*. Metabolic Brain Disease 12:1-3, 2014



## 1. WSTĘP

### 1.1 Mitochondria

Mitochondria są półautonomicznymi, otoczonymi podwójną błoną białkowo-lipidową organellami komórkowymi, które tworzą pewnego rodzaju rozgałęzioną sieć przypominającą retikulum endoplazmatyczne (Chinnery i Schon, 2003; Schapira, 2006; Bernard i wsp. 2006). Mitochondria posiadają własny genom – mitochondrialny DNA (mtDNA) (Schon i Manfredi, 2003), dziedziczą się niemendłowsko, odmatczyńnie, a podczas podziałów komórkowych ulegają losowej segregacji do komórek potomnych (Schapira, 2007). Liczba mitochondriów w danej komórce zależy od jej zapotrzebowań energetycznych - komórki o dużym zapotrzebowaniu na energię, takie jak komórki nerwowe, mięśniowe czy sercowe mają większą liczbę mitochondriów (Schapira, 2006; de Souza-Pinto i wsp., 2008).

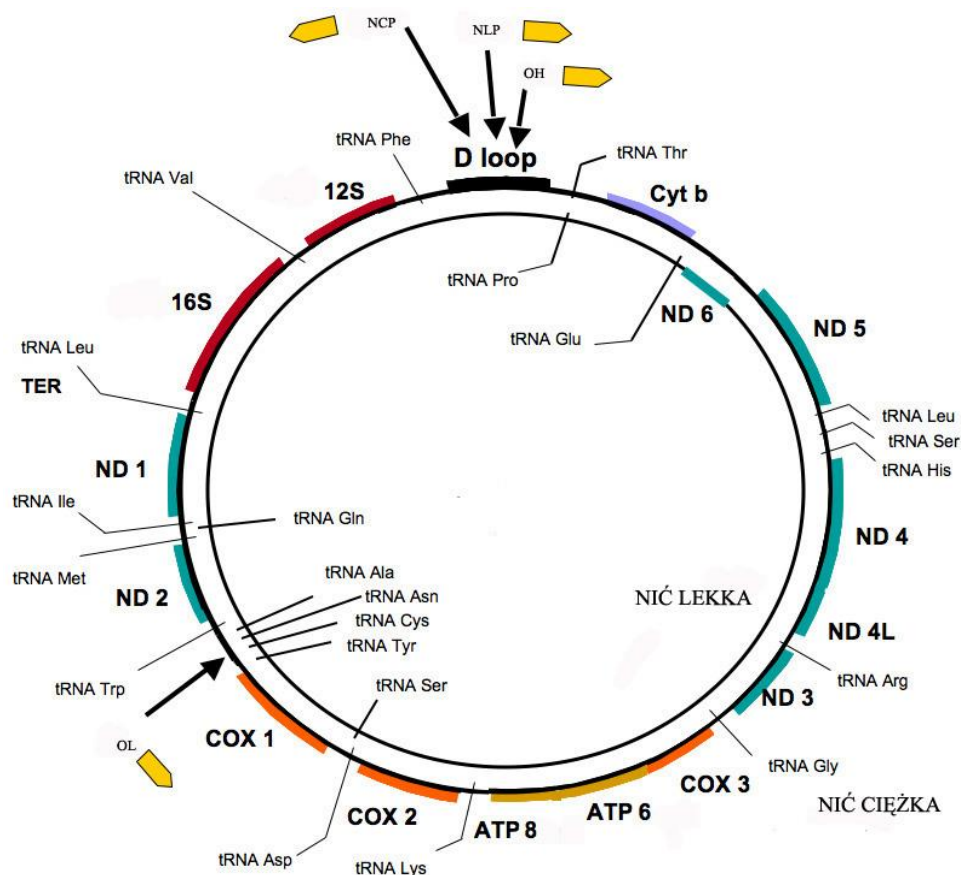
Główną funkcją mitochondriów jest produkcja energii w postaci ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej odbywającej się na kompleksach białkowych zlokalizowanych na wewnętrznej błonie mitochondrialnej tworzących tzw. łańcuch oddechowy (Reichert i Neupert, 2004). Do innych istotnych funkcji mitochondriów można zaliczyć między innymi udział w cyklu Krebsa (Bernard i wsp., 2006), procesie apoptozy (Chinnery i Schon, 2003) i produkcji reaktywnych form tlenu (ROS) (Wallace, 2013).

#### 1.1.1 Mitochondrialny DNA

Każde mitochondrium zawiera wiele kopii mtDNA o długości około 16569pz, a ich liczba jest zmienna i specyficzna komórkowo (Schapira, 2006). Pełną sekwencję mitochondrialnego DNA ustalono w 1981 r., a następnie zmodyfikowano i udostępniono jako sekwencję porównawczą do badań genetycznych ludzkiego mtDNA (ang. *revised Cambridge Reference Sequence* – rCRS, dostępna w bazie danych MITOMAP) (Bandelt i wsp., 2013).

Ludzki mtDNA ma strukturę dwuniciowej, kolistej cząsteczki. Nici mtDNA podzielono na nić ciężką, bogatą w guaniny i adeniny (ang. *heavy strand*, H) i lekką (ang. *light strand*, L), bogatą w cytozyny i tyminy (Cheng i Zhang, 2008).

Genom mitochondrialny koduje 22 tRNA, 2 rRNA i 13 białek z przynajmniej 90 kodujących podjednostki mitochondrialnego łańcucha oddechowego (Smits i wsp., 2010). Miejsca inicjacji transkrypcji oraz miejsce inicjacji replikacji mtDNA znajdują się w jedynym niekodującym białek fragmencie mtDNA, o długości około 1124pz określanym pętlą D



**Rysunek 1. Ludzki mitochondrialny DNA.** Oznaczenia: promotor transkrypcji nici ciężkiej (NCP), promotor transkrypcji nici lekkiej (NLP), miejsce inicjacji replikacji nici ciężkiej (O<sub>H</sub>), miejsce inicjacji replikacji nici lekkiej (O<sub>L</sub>), pętla D (D-loop). Opis cząsteczki mtDNA w tekście. (Nadege i wsp., 2009; zmodyfikowano).

Budowa mtDNA jest bardzo zwarta, nie zawiera intronów, a 6-10 cząsteczek mtDNA jest zorganizowanych w nukleoproteinowe kompleksy tzw. nukleoidy. Genom jądrowy koduje wszystkie białka niezbędne do przeprowadzenia mitochondrialnej replikacji, transkrypcji, translacji oraz naprawy mitochondrialnego genomu (Spelbrink, 2010; Tuppen i wsp., 2010; He i wsp., 2012). mtDNA jest cząsteczką bardzo polimorficzną. Ze względu na odmatczyne dziedziczenie mitochondriów mtDNA przekazywany jest jedynie w linii żeńskiej.

Tempo mutacji w mtDNA jest 10-20 razy większe niż w jądrowym DNA (Smits i wsp., 2010). Wynika to z faktu, że mtDNA jest narażony na ciągłe, szkodliwe działanie ROS produkowanych podczas OXPHOS, jak również braku ochronnego wpływu białek histonowych i braku efektywnych systemów naprawy mtDNA, a brak intronów

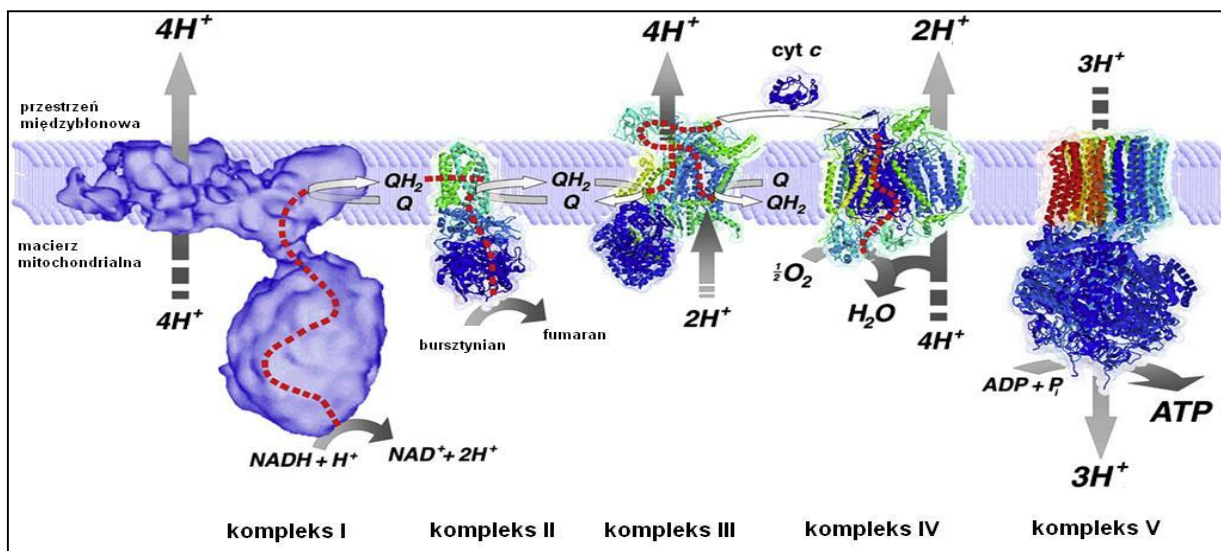
skutkuje występowaniem mutacji w genach kodujących białka łańcucha oddechowego albo w rejonach odpowiedzialnych za transkrypcję i translację (Jarrett i wsp., 2008).

W mitochondriach występuje wiele kopii cząsteczek mtDNA. Jeśli wszystkie te cząsteczki mają identyczną sekwencję, to taki stan określa się mianem homoplazmii, natomiast, gdy w komórkach współwystępują cząsteczki mtDNA o zróżnicowanej sekwencji, wtedy taką sytuację określa się jako heteroplazmię (Tuppen i wsp., 2010).

### **1.1.2 Mitochondrialny łańcuch oddechowy**

Mitochondrialny łańcuch oddechowy składa się z pięciu kompleksów białkowych zlokalizowanych na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Każdy kompleks składa się z wielu podjednostek białkowych kodowanych w zdecydowanej większości przez genom jądrowy. Kompleks I stanowi oksydoreduktaza NADH-koenzym Q (lub inaczej oksydoreduktaza NADH-ubichinon, NADH-Q), kompleks II oksydoreduktaza bursztynian-koenzym Q (dehydrogenaza bursztynianowa), kompleks III to oksydoreduktaza ubichinon:cytochrom c, kompleks IV to oksydaza cytochromu c, natomiast kompleks V to syntaza ATP (Schapira, 2006).

Na łańcuchu oddechowym odbywa się skoordynowany transport elektronów połączony z wypompowywaniem protonów wodorowych ( $H^+$ ) z macierzy mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej poprzez kompleksy I, III i IV, tworząc gradient elektrochemiczny w poprzek błony (Chinnery i Schon, 2003). Protony  $H^+$  wracają do macierzy mitochondrialnej poprzez kompleks V, a transport ten jest skorelowany z konwersją ADP do ATP. Końcowym akceptorem elektronów i wodorów jest tlen, w wyniku czego powstaje woda (Yu-Wai-Man i wsp., 2011). Ten skoordynowany proces transportu elektronów i protonów to fosforylacja oksydacyjna (OXPHOS) (Hüttemann i wsp., 2007), która odpowiada za produkcję 90% ATP w komórce (Barbour i Turner, 2014). Schemat fosforylacji oksydacyjnej na mitochondrialnym łańcuchu oddechowym przedstawiono na rysunku 2.



**Rysunek 2. Fosforylacja oksydacyjna na mitochondrialnym łańcuchu oddechowym.** Drogę przechodzenia elektronów na kolejnych przenośnikach zaznaczono czerwoną, przerywaną linią, a wypompowywane protony wodorowe zaznaczono szarymi strzałkami (Yu-Wai-Man i wsp., 2011; zmodyfikowano).

### 1.1.3 Kompleks I mitochondrialnego łańcucha oddechowego

Kompleks oksydoreduktaza NADH-ubichinon (NADH-Q, kompleks I) o masie ~ 1MDa jest największym i najbardziej złożonym białkowym kompleksem współtworzącym mitochondrialny łańcuch oddechowy (Lazarou i wsp., 2007). Kompleks I o kształcie litery „L” jest odpowiedzialny za transport elektronów z dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH) poprzez mononukleotyd flawinowy (FMN) i centra żelazowo-siarkowe na ubichinon, skąd dalej są przekazywane na kolejne przenośniki elektronów (rysunek 2). Składa się on z 45 polipeptydów kodowanych zarówno przez genom jądrowy jak i mitochondrialny. mtDNA koduje siedem podjednostek kompleksu I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 i ND6 - rysunek 1), a geny je kodujące obejmują 38% całej sekwencji mtDNA (Mitchell i wsp., 2006; Lazarou i wsp., 2007).

Najbardziej znanym inhibitorem kompleksu I jest rotenon, który ma własne miejsce wiązania zlokalizowane w sąsiedztwie miejsca wiązania ubichinonu. Rotenon hamuje transport elektronów między kompleksem I i ubichinonem (Pätsi i wsp., 2012; Ueno i wsp., 1994). Skutkuje to transportem elektronów nie na ubichinon, ale bezpośrednio na tlen z wytworzeniem rodnika nadtlenkowego, co powoduje zwiększoną produkcję ROS (Lambert i Brand, 2004) oraz spadek produkcji ATP (Li i wsp., 2003).

Najwięcej elektronów zostaje przekazanych na łańcuch oddechowy właśnie przez

kompleks I (Lazarou i wsp., 2007; Yu-Wai-Man i wsp., 2011), dlatego nieprawidłowości w jego pracy mogą skutkować poważnymi zaburzeniami produkcji ATP w komórkach. Zaburzenia kompleksu I są najczęstszym defektem funkcji łańcucha oddechowego, a mutacje w genach kodujących podjednostki tego kompleksu są znajdowane w różnych chorobach mitochondrialnych (Mitchell i wsp., 2006).

## **1.2 Zaburzenia mitochondrialne w patogenezie chorób człowieka**

Z racji zaangażowania mitochondriów w szereg ważnych procesów metabolicznych w komórkach, dysfunkcje ich działania opisywano w przypadku wielu chorób człowieka. Zaburzenia funkcji mitochondriów wiąże się z nowotworzeniem (Hedskog i wsp. 2012), neurodegeneracją (Schon i Manfredi, 2003), starzeniem (Jacobs, 2003) oraz występowaniem chorób mitochondrialnych (Schapira, 2006). Dysfunkcje metaboliczne mitochondriów mogą być spowodowane mutacjami w genomie mitochondrialnym lub jądrowym, jak również mogą wynikać z rearanżacji genomu mitochondrialnego i zaburzeń liczby kopii mtDNA. Mogą być również konsekwencją zaburzonej interakcji między dwoma genomami, a także zaburzonej homeostazy między biogenezą a degradacją mitochondriów (Cannino i wsp., 2007; Horan i wsp., 2013).

### **1.2.1 Choroby mitochondrialne**

Choroby mitochondrialne są heterogenną grupą zaburzeń wynikających z dysfunkcji łańcucha oddechowego. Choroby mitochondrialne spowodowane mutacjami w jądrowym DNA mogą dziedziczyć się w sposób autosomalny recesywny bądź dominujący (Chinnery, 2014), natomiast te wywołane mutacjami w mtDNA dziedziczą się odmatczyźnie.

Najnowsze szacunki zakładają, że choroby mitochondrialne dotyczą ~1:8500 osób dorosłych (Chinnery, 2014), a częstości te mogą być zaniżone, ze względu na dużą liczbę bezobjawowych nosicieli niektórych z tych chorób. Dotychczas zdiagnozowano dużą grupę różnych zespołów chorobowych zaklasyfikowanych jako choroby mitochondrialne (Reichert i Neupert, 2004).

Choroby mitochondrialne mogą wystąpić we wczesnym dzieciństwie, ale również mogą ujawnić się dopiero u dorosłych. Zazwyczaj mutacje w genach kodujących białka mitochondrialne mają działanie plejotropowe, powodując objawy fenotypowe ze strony wielu tkanek jednocześnie (Chinnery i Schon, 2003), a ponadto różne mutacje mogą wywołać

podobny efekt fenotypowy. Objawy tych chorób przejawiają się w tych tkankach, które mają największe zapotrzebowania energetyczne, takich jak nerwy, mięśnie, tkanka mózgowa czy sercowa (Chinnery, 2014). Ekspresja fenotypowa tej grupy chorób może znacznie różnić się między chorymi w obrębie jednej rodziny. Jest to spowodowane tym, że różne osoby w rodzinie mogą mieć inny poziom heteroplazmii danej mutacji w różnych tkankach ciała, co jest wynikiem mechanizmu „wąskiego gardła” w oocytach kobiet przekazujących chorobę, a także losowej segregacji mitochondriów do komórek potomnych oraz zmiennym tkankowo progiem patogenności danej mutacji (ang. *threshold*), czyli poziomem mutacji, którego przekroczenie powoduje wystąpienie objawów fenotypowych (Chinnery i Schon, 2003).

### 1.2.2 Zaburzenia mitochondrialne w tkance nerwowej

Neurony są komórkami bardzo aktywnymi metabolicznie o wysokim zapotrzebowaniu na ATP, a produkcja energii w tych komórkach opiera się przede wszystkim na mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej (Rugarli i Langer, 2012). Z tego powodu dysfunkcje mitochondrialne wewnątrz komórek nerwowych mogłyby doprowadzić do ich kryzysu energetycznego i metabolicznego prowadząc do ich śmierci (Hedskog i wsp., 2012).

Neurony nie dzielą się, dlatego są bardzo wrażliwe na akumulację toksycznych składników jak niesfaldowane białka, agregaty białkowe i dysfunkcyjne organella komórkowe, zatem wymagają wysoce sprawnego systemu degradacji komponentów cytoplazmatycznych zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych (Lee, 2012; Nikolettou i wsp., 2015).

Analizy zmian metabolicznych komórek w przebiegu różnych chorób układu nerwowego przemawiają za istotnym zaangażowaniem mitochondriów w proces neurodegeneracji. Z powodu wysokiej produkcji ROS w mitochondriach, organella te mają duży wkład w generację stresu oksydacyjnego w komórkach, czego wynikiem mogą być oksydacyjne uszkodzenia DNA, których akumulację obserwowano w DNA komórek pacjentów chorych na takie choroby neurodegeneracyjne jak choroba Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona czy ALS (de Souza-Pinto, 2008). W chorobach tych wielokrotnie diagnozowano także różnego rodzaju mutacje punktowe oraz delecje w mtDNA (Yang i wsp., 2008). W komórkach mózgu osób cierpiących na te choroby jak i w modelach zwierzęcych tych zaburzeń obserwowano obniżoną aktywność kompleksów łańcucha oddechowego, wzmożoną produkcję ROS (Federico i wsp., 2012), jak również zmianę morfologii



mitochondriów i zaburzenia ich wstecznego transportu aksonalnego (Magrané i wsp., 2013) oraz zakłócenia degradacji mitochondriów i ich akumulację w neuronach (Burman i wsp., 2012).

Zaburzenia w funkcjach, transporcie i degradacji mitochondriów w różnych chorobach neurodegeneracyjnych wskazują, że prawidłowy metabolizm i dystrybucja tych organelli komórkowych są niezbędne do zapewnienia homeostazy neuronalnej. Analizy dysfunkcji mitochondriów w neuronach są szczególnie istotne w kontekście chorób mitochondrialnych, w których występuje szereg złożonych zaburzeń ze strony układu nerwowego, takich jak drgawki, ataksje, encefalopatie, migreny, udary i zanik nerwu wzrokowego.

### **1.3. Dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera**

#### **1.3.1 Tło historyczne**

LHON (ang. Leber's hereditary optic neuropathy, Dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera, OMIM#535000) jest formą utraty wzroku w centralnym polu widzenia. Choroba została opisana po raz pierwszy w 1858 r. przez niemieckiego okulistę Albrechta Von Graefe (Chalmers i Schapira, 1999). Jednak dopiero 13 lat później, choroba została formalnie zdefiniowana i zdiagnozowana jako jednostka chorobowa przez innego niemieckiego okulistę Teodora Lebera (Carelli i wsp., 2004). Przez wiele lat nie można było jednak określić przyczyn choroby. Pierwotne hipotezy zakładały, że jest to choroba sprzężona z chromosomem X, potem zasugerowano dziedziczenie cytoplazmatyczne (Imai i Moriwaki, 1936), jednak przełomem w zdefiniowaniu przyczyn choroby okazała się identyfikacja mutacji punktowej m.11778G>A w genomie mitochondrialnym (Wallace i wsp., 1988). Powiązanie mutacji w mtDNA z chorobą było podstawą do identyfikacji kolejnych mutacji oraz badań nad zaburzeniami w funkcjonowaniu mitochondriów oraz komórek zawierających mitochondria ze zmutowanym DNA.

#### **1.3.2 Podłoże genetyczne choroby**

##### **1.3.2.1 Mutacje mitochondrialnego DNA**

Po identyfikacji przez Wallace'a i wsp. (1988) pierwszej mutacji w mtDNA przyczyniającej się do wystąpienia LHON, następne lata przyniosły odkrycia kolejnych mutacji, odpowiednio w pozycji 3460 w 1991 roku i w pozycji 14484 w 1992 roku (Chalmers

i Schapira, 1999). Dotychczas zidentyfikowano 32 mutacje powiązane z LHON i większość z nich dotyczy genów mitochondrialnych kodujących podjednostki kompleksu I łańcucha oddechowego (MITOMAP). Najczęściej stwierdza się mutacje odpowiedzialne za fenotyp LHON w genach *ND1*, *ND5* i *ND6* (MITOMAP).

U większości nosicieli LHON mutacje mitochondrialne występują w stanie homoplazmatycznym, tylko około 10% - 15% rodzin posiada mutacje LHON w formie heteroplazmatycznej (Man i wsp., 2002), jednak między pacjentami z mutacjami w formie heteroplazmii i homoplazmii nie obserwuje się różnic w ostrości objawów chorobowych (Huoponen, 2001).

### 1.3.2.2 Mutacje podstawowe odpowiedzialne za ekspresję fenotypową LHON

Mutacje m.11778G>A, m.3460G>A oraz m.14484T>C występują w genach kodujących podjednostki I kompleksu łańcucha oddechowego. Te trzy mutacje odpowiadają za około 96% przypadków LHON. Charakterystykę trzech najczęstszych mutacji odpowiedzialnych za LHON przedstawiono w tabeli 1.

**Tabela 1. Charakterystyka najczęstszych mutacji odpowiedzialnych za wystąpienie LHON (MITOMAP i OMIM\*).**

mutacja (pozycja w mtDNA)	gen mtDNA	zmiana nukleotydowa	zmiana aminokwasowa	siła konserwacji ewolucyjnej aminokwasu	* pacjenci z mutacją w Europie (%)
<b>11778</b>	<i>ND4</i>	G>A	R340H	silnie	~50
<b>3460</b>	<i>ND1</i>	G>A	A52T	umiarkowanie	~30
<b>14484</b>	<i>ND6</i>	T>C	M64V	słabo	~20

Najwięcej pacjentów jest nosicielami m.11778G>A, która odpowiada za około 50% przypadków LHON w Europie i ponad 95% przypadków w Azji. Mutacje m.3460G>A i m.14484T>C odpowiadają odpowiednio za około 30% i około 20% przypadków LHON w Europie (OMIM). Jednak częstości te mogą znacznie różnić się między populacjami z różnych rejonów świata, na przykład m.14484T>C nigdy nie zanotowano w Finlandii, natomiast mutacja ta jest najczęstszą przyczyną LHON u Kanadyjczyków pochodzenia francuskiego, co tłumaczy się efektem założyciela (Huoponen, 2001; Yu-Wai-Man i wsp., 2011). Wszystkie trzy mutacje przyczyniają się do zmiany aminokwasu w kodowanym



białku, przy czym do zmiany najbardziej konserwowanego ewolucyjnie aminokwasu przyczynia się mutacja m.11778G>A.

### 1.3.2.3 Mutacje rzadkie i kandydujące do LHON

W bazie MITOMAP umieszczonych jest 18 tzw. „mutacji kandydujących do LHON”, które notowano tylko w przypadku pojedynczych pacjentów lub rodzin.

Co jakiś czas w literaturze pojawiają się doniesienia o zidentyfikowaniu kolejnych mutacji powiązanych z LHON, jednak aby móc zakwalifikować nowoodkryty wariant jako mutację patogenną musi on spełniać szereg różnych warunków (Wallis i wsp., 2013), do których można zaliczyć:

1. kosegregację wariantu genu z chorobą
2. brak detekcji nowego wariantu u dużej liczby zdrowych osób
3. nowoodkryty wariant skutkuje substytucją wysoce konserwowanego aminokwasu na inny
4. potwierdzenie badaniami *in vivo* (obecnie trudne do zweryfikowania w przypadku LHON) i *in silico* negatywnego wpływu wariantu na metabolizm komórek, funkcjonowanie organizmu, fałdowanie białek, transkrypcję, translację itp.

Ponadto nowoodkryty wariant może być uznany za patogenny także jeśli u innych członków rodziny chorego probanda zmiana ta nie została zidentyfikowana, a nadal spełnia pozostałe wyżej wymienione warunki patogenności. W takiej sytuacji nowy wariant może wynikać z mutacji powstałej u chorego *de novo*. Mutacje *de novo* zdarzają się bardzo rzadko, choć były opisywane przypadki LHON spowodowane mutacjami *de novo* w pozycji 3460 (Yu-Wai-Man i wsp., 2003) i 14484 (Biousse i wsp., 1997).

### 1.3.2.4 Mutacje podwójne u pacjentów z LHON

Występowanie u jednego pacjenta dwóch mutacji mitochondrialnych powodujących chorobę jest niezwykle rzadkie. W literaturze opisano jedynie kilka przypadków rodzin posiadających jednocześnie dwie mutacje charakterystyczne dla LHON. Część ze zidentyfikowanych wcześniej podwójnych mutacji były kombinacjami jednej z trzech podstawowych mutacji LHON z inną mutacją nie powiązaną wcześniej z tą chorobą. U niektórych z tych pacjentów oprócz zaniku wzroku diagnozowano dodatkowe zaburzenia neurologiczne bądź kardiologiczne (Wei i wsp., 2007; Mimaki i wsp., 2003).

Współwystępowanie dwóch mutacji podstawowych odpowiedzialnych za rozwój LHON jest jeszcze rzadziej spotykanym zjawiskiem. W literaturze jest tylko kilka doniesień o zdiagnozowaniu pacjentów posiadających dwie mutacje podstawowe LHON jednocześnie, i w każdym z tych opisanych przypadków mutacja m.11778G>A współwystępowała z m.14484T>C (Brown i wsp., 2001). U niektórych z tych pacjentów zanikowi wzroku towarzyszyły ciężkie encefalopatie (Howell i wsp., 2002).

W 2008 roku w Instytucie Genetyki i Biotechnologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, u 7 członków polskiej rodziny (sześciorga rodzeństwa i ich matki) została zidentyfikowana kombinacja dwóch podstawowych mutacji LHON m.11778G>A oraz m.3460G>A (Tońska i wsp., 2008). Matka oraz córka mimo obecności mutacji były bezobjawowe, natomiast 5 synów wykazywało objawy postępującego zaniku nerwu wzrokowego. U wyżej wymienionych chorych pacjentów, utrata wzroku była jedynym przejawem fenotypowym choroby. Kombinacja obu mutacji m.11778G>A i m.3460G>A u pacjentów z LHON nigdy wcześniej nie była opisywana w literaturze i wpływ obecności tych dwóch mutacji jednocześnie na metabolizm komórek nie jest znany.

### **1.3.3 Obraz kliniczny LHON**

W LHON dochodzi do nagłej, bezbolesnej utraty wzroku związanej z zaburzeniami nerwu wzrokowego. LHON charakteryzuje duża, wyraźna dysproporcja w zachorowaniu między płciami jak i opóźniona ekspresja choroby. Dotyka ona najczęściej młodych mężczyzn w drugiej i trzeciej dekadzie życia, choć zdarzają się również zachorowania w późniejszym wieku, jednak u 95% pacjentów choroba ujawnia się przed 50 rokiem życia (Chalmers i Schapira, 1999). W LHON obserwuje się niepełną penetrację choroby, która objawia się fenotypowo u około 50% mężczyzn będących nosicielami mutacji i tylko u około 10-15% żeńskich nosicielek (Kirches, 2011). Dane literaturowe wskazują również, że objawowe nosicielki mają większe prawdopodobieństwo posiadania chorych dzieci, w szczególności córek, w porównaniu do bezobjawowych nosicielek (Newman i Biousse, 2004).

U chorych na LHON o typowym przebiegu, jedynym objawem jest postępująca utrata wzroku w centralnym polu widzenia (tzw. „mroczek centralny”) spowodowana degeneracją komórek zwojowych siatkówki (RGC) i ich aksonów.

Początek choroby może sugerować rozmywanie się i zachodzenie mgłą pola widzenia. Podczas badań i diagnostyki okulistycznej LHON obserwuje się różne zaburzenia

w zależności od fazy choroby. Na początku fazy bezobjawowej w badaniu oftalmoskopowym obserwuje się mikroangiopatię okołoplamkową. Pod koniec fazy bezobjawowej występuje poszerzenie drobnych naczyń krwionośnych (teleangiektazje), wzrasta przekrwienie oraz następuje obrzęk, opuchnięcie tarczy nerwu wzrokowego. Następnym stadium choroby jest faza ostra, w której zaczynają się pojawiać zaniki wzroku. W fazie tej diagnozuje się ostre przekrwienie i postępujący obrzęk tarczy nerwu wzrokowego, obrzęk włókien nerwowych, rozszerzenie tętnic w oku, błądź włókien nerwowych oraz angiopatie, chociaż badanie angiograficzne nie wykazuje przecieków z naczyń krwionośnych siatkówki (Harding i wsp., 1995; Kisza, 2010; Huoponen, 2001). W tej fazie dochodzi do powolnej utraty widzenia w polu centralnym poprzez pojawienie się tzw. „mroczka centralnego”. U około 20% pacjentów z LHON w fazie ostrej choroby wygląd tarczy nerwu wzrokowego nie odbiega od normy (Man i wsp., 2002), a u niektórych nawet jeśli zdiagnozuje się u objawy fazy ostrej choroby, może nigdy nie rozwinąć się chroniczna postać prowadząca do zaniku wzroku (Newman i Biousse, 2004). W miarę rozwoju choroby mikroangiopatia zanika, natomiast postępuje degeneracja włókien nerwu wzrokowego i rozszerza się mroczek centralny prowadząc do zaniku centralnego pola widzenia (Huoponen, 2001). Przykładowe symulacje zaburzeń widzenia jakich doświadczają pacjenci z LHON przedstawiono na rysunku 3.

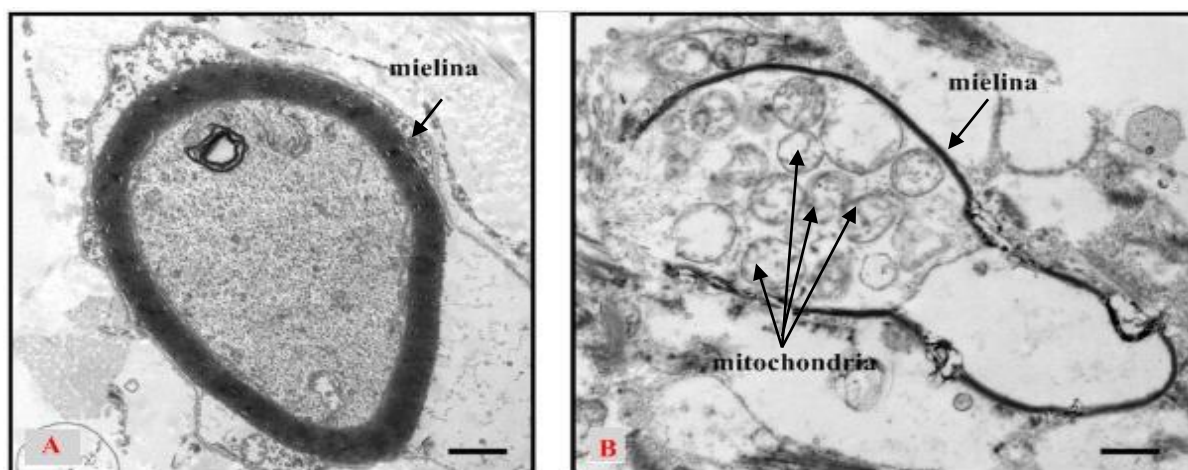


**Rysunek 3. Przykładowe symulacje zaburzeń widzenia jakich doświadczają pacjenci z mutacjami LHON.** Na zdjęciu A obraz widziany przez zdrowe osoby, na zdjęciu B ten sam obraz widziany przez osoby, u których wystąpiły symptomy zaniku nerwu wzrokowego spowodowane mutacjami mitochondrialnymi wywołującymi LHON. U pacjentów z LHON występuje zamglenie pola widzenia oraz rozszerza się mroczek centralny (czarny punkt w polu widzenia) (zdjęcia pochodzą ze strony stowarzyszenia chorych na LHON oraz naukowców zajmujących się tą chorobą: <http://lhonsociety.org>).

W LHON bardzo często dochodzi do utraty widzenia barwnego, natomiast odruch źreniczny zostaje zachowany podobnie jak reakcja na światło, a pacjenci nie odczuwają bólu

podczas poruszania gałkami ocznymi (Man i wsp., 2002; Kiswa, 2010).

W badaniach nerwu wzrokowego pacjentów z LHON przeprowadzonych *post mortem* obserwuje się postępującą degenerację komórek nerwowych, utratę mieliny oraz akumulację w aksonach obrzmiałych mitochondriów. W niektórych przypadkach mitochondria w pełni wypełniają akson komórki nerwowej (Carelli i wsp., 2004). Przykładowy obraz komórek nerwu wzrokowego od osób zdrowych i z LHON przedstawiono na rysunku 4.



**Rysunek 4.** Zdjęcie z mikroskopu elektronowego przedstawiające włókno nerwu wzrokowego. Na zdjęciu A przedstawiono akson normalnej komórki nerwowej od zdrowej osoby z widoczną grubą warstwą mieliny (strzałka). Na rysunku B przedstawiono akson komórki z degenerującego nerwu wzrokowego – widoczna jest cienka warstwa mieliny oraz akumulacja mitochondriów w cytoplazmie komórki (oznaczone strzałkami) (Carelli i wsp., 2004; zmodyfikowano).

#### 1.3.4 Rokowania dotyczące możliwości ustąpienia objawów zaniku wzroku w LHON

Jednoczesna utrata wzroku w obu oczach występuje u około 25% nosicieli mutacji LHON. W większości przypadków zazwyczaj pogorszenie ostrości widzenia następuje sekwencyjnie, najpierw w jednym potem w drugim oku, z przerwą pomiędzy nimi wynoszącą od kilku tygodni do kilku miesięcy i chociaż występują dłuższe okresy utajenia choroby, jednak u 97% pacjentów zanik wzroku w drugim oku rozwija się w ciągu roku od wystąpienia objawów w pierwszym (Huoponen, 2001; Abu-Amero, 2011). Utrata wzroku w LHON jest nieodwracalna, jednak doniesienia literaturowe wskazują, że zdarzają się spontaniczne poprawy jakości widzenia. Poprawa widzenia może nastąpić w ciągu 6 miesięcy do roku od wystąpienia objawów, choć zdarzają się przypadki poprawy widzenia po 10 latach. Poprawa widzenia może przybrać formę rozjaśniania się pola widzenia, albo mogą występować pojedyncze punkty zwiększonej ostrości widzenia w polu centralnym. Ustąpienie objawów

choroby może dotyczyć zarówno obu oczu jak i tylko jednego, i występuje częściej u pacjentów, którzy zachorowali w młodszym wieku (Newman i Biousse, 2004). Poprawa jakości widzenia po wystąpieniu objawów LHON ściśle zależy od rodzaju mutacji w mtDNA i występuje u około 4% nosicieli m.11778G>A i u 22% nosicieli m.3460G>A. Najlepsze prognozy dotyczące możliwości ustąpienia objawów choroby dotyczą m.14484T>C, gdzie spontaniczna poprawa wzroku występowała u około 37% chorych (OMIM). Mechanizm molekularny, odpowiedzialny za ustąpienie objawów LHON, nie został dotychczas zbadany.

### **1.3.5 Zespół LHON plus**

Część mutacji odpowiedzialnych za neuropatię LHON powoduje szerokie spektrum objawów klinicznych, od utraty wzroku aż do złożonego kompleksu zaburzeń neurologicznych. W takich przypadkach mówimy o wystąpieniu zespołu LHON-plus (Achilli i wsp., 2012). Do dodatkowych objawów w zespole LHON-plus należą dystonie, objawy powiązane z zespołem MELAS czy encefalopatie. Zespół LHON + dystonia zdiagnozowano także u dwóch rodzin z mutacją m.11778G>A i u jednej rodziny z mutacją m.3460G>A (Fraser i wsp., 2010).

### **1.3.6 Epidemiologia LHON**

Obecnie uważa się, że LHON jest najczęstszą chorobą mitochondrialną (Man i wsp., 2002). Częstość LHON w populacjach europejskich jest zbliżona, a określona dla niektórych państw wynosi odpowiednio około 1:30000 dla północno-wschodniej Anglii, 1:40000 w Holandii, a w Danii i Finlandii 1:50000. W Australii 2% zdiagnozowanych zaburzeń widzenia związanych jest z atrofią nerwu wzrokowego wywołanego mutacjami LHON (Newman i Biousse, 2004; Yu-Wai-Man i wsp., 2011). Podane częstości mogą jednak być zaniżone ze względu na dużą liczbę bezobjawowych nosicieli choroby.

### **1.3.7 Czynniki przyczyniające się do ekspresji choroby**

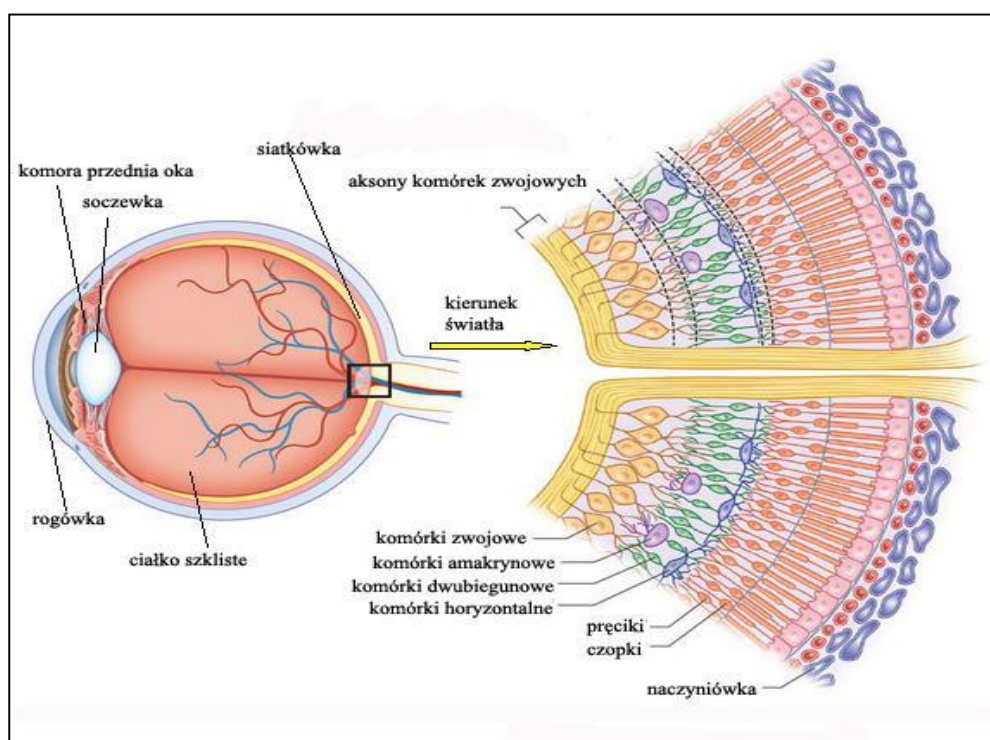
LHON charakteryzuje nietypowy wśród chorób mitochondrialnych przebieg, jak ograniczenie objawów tylko do jednej tkanki, niepełna penetracja, opóźniona ekspresja oraz wyraźna różnica w częstości zachorowania między żeńskimi i męskimi nosicielami mutacji. Ze względu na te cechy postuluje się szereg różnych czynników, które mogą wpływać na ekspresję choroby, takich jak anatomiczne, hormonalne, genetyczne i środowiskowe.



### 1.3.7.1 Czynniki anatomiczne

Światło wpadające do oka biegnie przez rogówkę, komorę przednią oka, soczewkę, ciało szkliste by w końcu dotrzeć do siatkówki wywołując wrażenia wzrokowe, które za pomocą impulsów elektrycznych przekazywane są do ośrodków wzrokowych w mózgu. Siatkówka jest wielowarstwową tkanką, o grubości około 0,5mm złożoną z różnych typów komórek tworzących trzy główne warstwy - warstwę jądristą zewnętrzną złożoną z komórek receptorowych (czopków i pręcików), warstwę jądristą wewnętrzną złożoną z komórek dwubiegunowych, amakrynowych i horyzontalnych, oraz warstwę komórek zwojowych, których aksony tworzą nerw wzrokowy opuszczający przestrzeń oka kierując się do mózgu (Kolb, 2005). Komórki zwojowe siatkówki są tymi komórkami, które ulegają degeneracji w LHON.

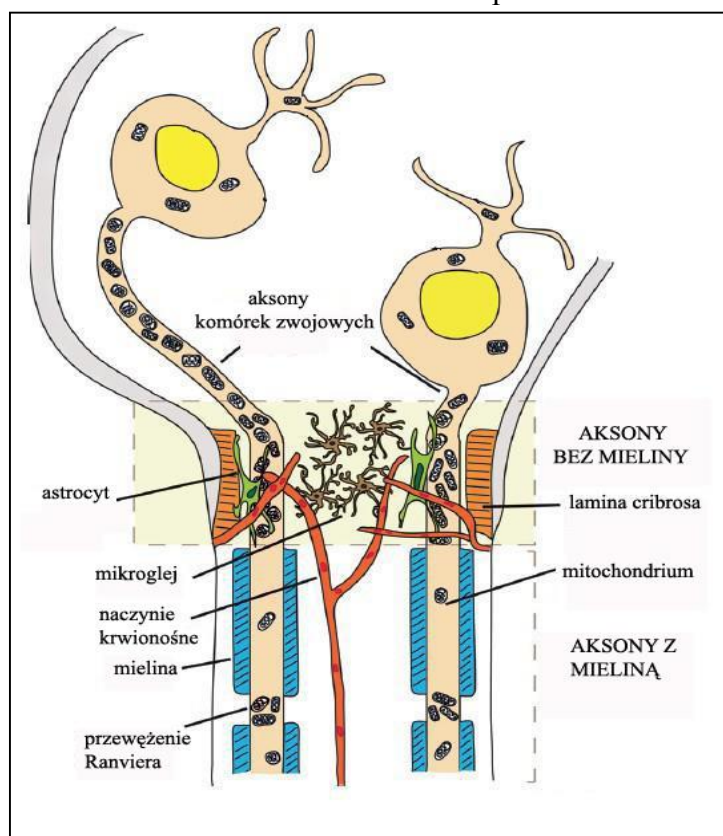
Anatomię siatkówki oka wraz z rozmieszczeniem komórek zwojowych względem innych w siatkówce przedstawiono na rysunku 5.



**Rysunek 5. Uproszczona anatomia siatkówki oka.** Przedstawiono zbliżenie fragmentu siatkówki z najważniejszymi komórkami budującymi poszczególne jej warstwy. Aksony komórek zwojowych siatkówki tworzą nerw wzrokowy (<http://www.retinareference.com/anatomy/>; zmodyfikowano).

Nerw wzrokowy, nazywany także drugim nerwem czaszkowym, ma za zadanie transfer impulsów wizualnych z siatkówki do ośrodków wzrokowych w mózgu. Ma on

długości od 5-6cm i jest zbudowany z około 1-2,2 miliona aksonów komórek zwojowych siatkówki. Aksony komórek zwojowych siatkówki budujące nerw wzrokowy posiadają osłonkę mielinową, ale pojawia się ona dopiero po opuszczeniu przez nerw wzrokowy wnętrza oka poprzez blaszkę sitową twardówki (łac. *lamina cribrosa*). Wcześniejsza część tego nerwu nie posiada osłonki mielinowej. Niezmielinizowana część wolniej przewodzi sygnał elektryczny i potrzebuje więcej energii do wzbudzenia potencjału elektrycznego niż w przypadku części zmielinizowanej, gdzie impuls nerwowy jest przewodzony szybciej drogą skokową (tzw. przewodzenie skokowe-saltacyjne). To zmienne zapotrzebowanie na energię jest skorelowane z rozłożeniem mitochondriów wzdłuż aksonu – niezmielinizowana część ma większe zagęszczenie mitochondriów niż część zmielinizowana (Carelli i wsp., 2004.) Komórki zwojowe siatkówki, których aksony tworzą nerw wzrokowy, wraz z zaznaczeniem mielinizacji i rozłożenia mitochondriów w aksonach przedstawiono na rysunku 6.



**Rysunek 6. Komórki zwojowe siatkówki, których aksony tworzą nerw wzrokowy.** Akson po przejściu przez blaszkę sitową twardówki ulega mielinizacji. Widoczna jest różnica w ilości mitochondriów między częścią zmielinizowaną a pozbawioną osłonki mielinowej (Osborne i del Olmo-Aguado, 2013; zmodyfikowano).

Zmienna mielinizacja aksonów komórek zwojowych siatkówki oraz połączona z nią nierównomierna dystrybucja w nich mitochondriów oraz zróżnicowane zapotrzebowanie na

produkcję energii w różnych częściach komórki nerwowej, sprawia, że w przypadku zaburzeń pracy mitochondriów bądź ich transportu, może dojść do istotnych nieprawidłowości w przewodzeniu impulsów elektrycznych, stabilności aksonów i w końcu ich degeneracji, co ma miejsce w przebiegu LHON. Biogeneza mitochondriów odbywa się w ciele komórki, skąd są transportowane w kierunku aksonów, dlatego każde zaburzenie w ich transporcie może wiązać się z deficytem energetycznym różnych fragmentów nerwu wzrokowego (Kirches, 2011). Ponadto czynnikiem szkodliwym dla funkcjonowania komórek zwojowych siatkówki jest także ich stała ekspozycja na promieniowanie słoneczne o długości fali 400-760nm. Bardziej narażone są niezmielinizowane części aksonów niż te, znajdujące się w dalszej części nerwu wzrokowego. Kompleksy tworzące mitochondrialny łańcuch oddechowy, szczególnie oksydaza cytochromu c, mogą absorbować promieniowanie słoneczne w zakresie 400-450nm, może to prowadzić do zaburzenia pracy enzymatycznej kompleksów i wzmożonej produkcji wolnych rodników tlenowych oraz przekładać się na zaburzenia energetyczne w komórkach prowadzące do ich śmierci. Hipotezę tą dodatkowo mogą wspierać wyniki eksperymentów na szczurzych komórkach zwojowych siatkówki, gdzie ekspozycja na światło o długości 400-760nm zwiększała ilość komórek apoptotycznych w hodowli (Osborne i wsp., 2006).

#### **1.3.7.2 Czynniki hormonalne**

Zważywszy na dużą dysproporcję płciową między chorymi na LHON nie można pominąć ważnego czynnika, który wpływa na metabolizm całego organizmu, mianowicie wpływu hormonów, a przede wszystkim estrogenów. Analizy komórek z trzema najczęstszymi mutacjami LHON wykazały zmniejszony potencjał błonowy, zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu i podatność na apoptozę w porównaniu do komórek kontrolnych (Giordano i wsp., 2011). Natomiast suplementacja pożywki 17 $\beta$ -estradiolem łagodziła te zaburzenia, a ponadto zwiększała poziom enzymu antyoksydacyjnego dysmutazy ponadtlenkowej 2 (SOD2) oraz aktywowała biogenezę mitochondriów i poprawiała metabolizm energetyczny. Wykazano także, że receptory estrogenowe znajdują się w siatkówce oka, a szczególnie duża ich ekspresja występowała w komórkach zwojowych siatkówki (Giordano i wsp., 2011; Yu-Wai-Man i wsp., 2011). Wyniki te sugerują, że żeńskie hormony płciowe z grupy estrogenów w znacznym stopniu mogłyby wpływać na zmienną penetrację LHON działając protekcyjnie i niwelując negatywny wpływ mutacji mitochondrialnych.



### 1.3.7.3 Czynniki genetyczne

Różne warianty mtDNA poklasyfikowano na grupy o wspólnym pochodzeniu i zbliżonych sekwencjach, tak zwane haplogrupy. Daną haplogrupę charakteryzuje zestaw polimorfizmów odziedziczonych od wspólnego przodka. Na ludzkim drzewie filogenetycznym można wyróżnić 18 głównych haplogrup mtDNA, a najbardziej charakterystycznymi dla Europy są haplogrupy H, U, T, J, K, I, W, V i X. Najczęstsza haplogrupa H występuje u prawie połowy Europejczyków (MITOMAP; Yu-Wai-Man i wsp., 2011).

Analizy korelacji między haplogrupami mtDNA a występowaniem LHON wykazały, że w populacji europejskiej mutacje m.11778G>A i m.14484T>C są powiązane z haplogrupą J, w szczególności podhaplogrupą J1 w przypadku m.14484T>C oraz podhaplogrupami J1c i J2b w przypadku m.11778G>A. Jedną z hipotez wyjaśniającą zwiększoną częstość występowania haplogrupy J wśród nosicieli tych dwóch mutacji jest taka, że zestawienie polimorfizmów tej haplogrupy: 4216C/ND1-10398G/ND3-13708A/ND5 może zwiększać penetrację mutacji m.11778G>A i m.14484G>A i ryzyko wystąpienia LHON (Torroni i wsp., 1997; Carelli i wsp., 2006; Carelli i wsp., 2007). Analogiczne analizy dla mutacji m.3460G>A wskazały, że nosiciele tej mutacji mieli większe prawdopodobieństwo utraty wzroku, jeśli należeli do mitochondrialnej haplogrupy K (Hudson i wsp., 2007).

Większej zachorowalności na LHON wśród mężczyzn nie można wytłumaczyć dziedziczeniem mitochondrialnym, ponieważ przy identycznym tle mitochondrialnym i obecności tych samych mutacji na identycznym lub zbliżonym poziomie u kobiet i mężczyzn, w większości przypadków chorują tylko mężczyźni nosiciele mutacji. Dlatego postuluje się istnienie dodatkowych genów modyfikujących ekspresję choroby w genomie jądrowym, w szczególności położonych na chromosomie X. Sugeruje się, że mutacje w genach na chromosomie X musiałyby mieć charakter recesywny, co wtedy wyjaśniałoby dysproporcje zachorowalności na LHON między kobietami a mężczyznami (Man i wsp., 2002; Carelli i wsp., 2004). Taki model zakłada, że LHON jest chorobą dwugenową, mitochondrialno-jądrową. Badania asocjacyjne przeprowadzone na pacjentach z LHON w Brazylii, wskazują, że w regionie q25-27.2 chromosomu X może istnieć gen zwiększający ryzyko utraty wzroku u nosicieli mutacji m.11778G>A (Shankar i wsp., 2008). Niestety mimo licznych analiz i symulacji komputerowych na razie nie udało się zidentyfikować konkretnych genów predysponujących do zwiększonej ekspresji LHON, a badania nad

poszukiwaniem takich jądrowych genów modulujących ekspresję tej choroby, zarówno na chromosomie X jak i na autosomach, nadal trwają.

#### **1.3.7.4 Czynniki środowiskowe**

Najwięcej uwagi w doniesieniach literaturowych dotyczących wpływu środowiska na ekspresję LHON poświęca się badaniom korelacji między paleniem tytoniu i piciem alkoholu a zwiększoną predyspozycją do zachorowania.

Badania przeprowadzone na 196 objawowych i 206 bezobjawowych nosicielach najczęstszych mutacji odpowiedzialnych za LHON wykazały silną korelację między paleniem papierosów a zwiększoną penetracją tej choroby. Takiej silnej korelacji nie wykazano w stosunku do spożywania alkoholu (Kirkman i wsp., 2009; Yu-Wai-Man i wsp., 2014). Oznacza to, że palenie papierosów w znacznym stopniu zwiększa prawdopodobieństwo wystawienia objawów choroby u nosicieli mutacji LHON i jest to czynnik, którego zdiagnozowani nosiciele powinni unikać, aby zmniejszyć ryzyko utraty wzroku.

#### **1.3.8 Metody leczenia LHON**

Obecnie trwają intensywne badania nad stworzeniem odpowiedniej terapii LHON, ponieważ dotychczas nie ma skutecznej metody leczenia. Testuje się szereg różnych leków i terapii mogących zniwelować skutki mutacji. W ostatnich latach przeprowadzane są próby kliniczne leku o nazwie idebenon, syntetycznego analogu ubichinonu, który umożliwia przepływ elektronów na kompleks III z pominięciem dysfunkcyjnego w przypadku LHON kompleksu I (Haefeli i wsp., 2011). Wstępne dane z badań klinicznych wskazują, że lek ten poprawił jakość widzenia u niektórych pacjentów z LHON (Sadun i wsp., 2011; Klopstock i wsp., 2011). Lekami potencjalnie przydatnymi w niwelowaniu skutków mutacji LHON mogłyby być leki neuroprotekcyjne, zwiększające biogenezę mitochondrialną, a także pochodne estrogenów i antyoksydanty (Sadun i wsp., 2011; Carelli i wsp., 2004). Nadzieję na wyeliminowanie przyczyn choroby upatruje się w terapii genowej, której próby przeprowadza się na zwierzętach, a ich założeniem jest zastąpienie wadliwych genów prawidłowymi (Kirches, 2011; Yu-Wai-Man i wsp., 2011).

W Wielkiej Brytanii Parlament niedawno wyraził zgodę na procedurę zapobiegania przenoszenia choroby poprzez rozwinięcie techniki zapłodnienia pozaustrojowego (IVF), poprzez transfer jądra komórkowego z oocytów nosicielki mutacji w mtDNA do pozbawionej

jądra komórki jajowej zdrowej dawczyni. Dopiero po takim transferze ma być przeprowadzone zapłodnienie *in vitro*. Powstały zarodek powinien posiadać zdrowe mitochondria, a dziedziczenie choroby mitochondrialnej zostać zahamowane (Yu-Wai-Man i wsp., 2011).

### **1.3.9 Zanik nerwu wzrokowego w LHON i innych chorobach mitochondrialnych**

W klasycznej postaci LHON utracie wzroku nie towarzyszą dodatkowe objawy. Inną chorobą mitochondrialną, w której występuje izolowany objaw ograniczony do zaniku nerwu wzrokowego jest autosomalny dominujący zanik nerwu wzrokowego lub inaczej zanik nerwu wzrokowego typu Kjera (ADOA). Obie te choroby, LHON i ADOA, poprzez swoje ograniczenie w ekspresji choroby do jednej tkanki, są wyjątkami wśród chorób mitochondrialnych, gdyż w przypadku innych chorób wywoływanych mutacjami genów kodujących białka mitochondrialne zarówno w genomie mitochondrialnym jak i jądrowym, u chorych obserwuje się szerokie spektrum objawów (Chinnery i Schon, 2003; Chinnery, 2014).

W innych zespołach mitochondrialnych zanik nerwu wzrokowego jest tylko jednym z wielu objawów. Występuje w takich zespołach jak zespół chorób LHON/dystonia/MELAS/Zespół Leigha, ataksja Friedreicha, syndrom Mohr-Tranebjerg, dziedziczna paraplegia spastyczna z mutacją w genie SPG7, zespół Charcot-Marie-Tooth typ 2A (CMT2A) czy zespół Costeffa (Carelli i wsp., 2009). Oznacza to, że zanik nerwu wzrokowego w LHON nie jest objawem nietypowym dla chorób mitochondrialnych, a nietypowe w LHON jest jedynie ograniczenie objawów wyłącznie do nerwu wzrokowego.

## **1.4 Hipotezy dotyczące mechanizmu śmierci komórek zwojowych siatkówki**

Dotychczas wysunięto kilka hipotez tłumaczących patogeny wpływ mutacji mitochondrialnych na funkcjonowanie komórek pacjentów z LHON.

Postuluje się, że w komórkach z mutacjami LHON zaburzona jest homeostaza wapniowa, dochodzi do wzrostu przepuszczalności porów mitochondrialnych (Kirches, 2011), a do większej śmiertelności komórek zwojowych siatkówki mógłby się przyczynić także wzrost poziomu glutaminianu, działającego toksycznie na komórki nerwowe (Kirches, 2011; Vorwerk i wsp., 1996).

Najczęstsze hipotezy dotyczące zaniku nerwu wzrokowego w przebiegu LHON

wskazują na zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej powiązane z dysfunkcją kompleksu I w mitochondriach komórek nerwowych siatkówki, co prowadzi do spadku produkcji ATP, wzrostu produkcji ROS oraz stresu oksydacyjnego, co w konsekwencji powoduje śmierć neuronów zwojowych siatkówki. Nie określono jednoznacznie ścieżki, na której dochodzi do śmierci komórek nerwu wzrokowego, ale najczęściej postuluje się ścieżkę apoptotyczną, chociaż nie można także wykluczyć, że komórki te mogą umierać na innej drodze programowanej śmierci komórkowej, na przykład na drodze autofagii.

#### **1.4.1 Zaburzenia kompleksu I łańcucha oddechowego w komórkach z mutacjami LHON**

Hipoteza o wpływie dysfunkcji kompleksu I łańcucha oddechowego na zwiększoną śmiertelność komórek pacjentów z LHON, wiąże się z tym, że najczęstsze mutacje odpowiedzialne za tę chorobę występują w genach kodujących białkowe podjednostki tego kompleksu. Hipoteza ta została również podparta badaniami na liniach komórkowych limfoblastów, które wykazały spadek aktywności kompleksu I o 20% i oddychania komórkowego o 30-36% w przypadku m.11778G>A i spadek aktywności enzymatycznej o 79% oraz oddychania komórkowego o 20-28% w przypadku m.3460G>A (Brown i wsp., 2000). Podobną tendencję zanotowano w innych, niezależnych badaniach z użyciem cybryd niosących te mutacje (Floreani i wsp., 2005) (model cybrydowy opisano w rozdziale 1.5). Obniżenie aktywności mitochondrialnych kompleksów oddechowych obserwowano również w innych chorobach neurodegeneracyjnych (Federico i wsp., 2012), co dodatkowo może sugerować zaangażowanie zaburzeń fosforylacji oksydacyjnej w śmierć komórek zwojowych siatkówki w przebiegu LHON.

#### **1.4.2 Stres oksydacyjny**

Głównym źródłem reaktywnych form tlenu w komórce są mitochondria. ROS generowane są przede wszystkim na poziomie I i III kompleksu łańcucha oddechowego (Li i wsp., 2003). Rodnik ponadtlenkowy ( $\text{O}_2^-$ ) jest główną reaktywną formą tlenu produkowaną w trakcie fosforylacji oksydacyjnej, a powstaje w wyniku „ucieczki” z białkowych kompleksów bezpośrednio na tlen powodując jego redukcję (Jarrett i wsp., 2008). W wyniku szeregu przemian chemicznych rodnika ponadtlenkowego powstają bardziej reaktywne formy tlenu odpowiedzialne za uszkodzenia oksydacyjne DNA, białek i lipidów (Nakabeppu i wsp., 2004).

Kilka czynników przemawia za istotną rolą stresu oksydacyjnego w patofizjologii LHON. Wzmożoną produkcję reaktywnych form tlenu notowano w komórkach neuronalnych linii Ntera2/D1 (NT2) z mutacjami m.11778G>A i m.3460G>A. Zaobserwowano 2,5-krotny wzrost produkcji ROS, ale efekt ten był widoczny jedynie w linii NT2 z mutacjami LHON wyróżnianych w kierunku komórek o neuronalnej morfologii i wzorze ekspresji genów, które posiadały zdolności przewodzenia impulsów elektrycznych (Wong i wsp., 2002). Może to oznaczać, że mitochondria z mutacjami LHON produkują więcej ROS jedynie w środowisku neuronalnym. Ponadto wynik taki mógłby częściowo tłumaczyć tkankowo specyficzną ekspresję mutacji LHON.

Pośrednich dowodów na udział stresu oksydacyjnego w patogenezie LHON dostarczają wyniki badań na cybrydach, które wykazały obniżenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych w komórkach z mutacjami m.11778G>A oraz m.3460G>A (Floreani i wsp., 2005).

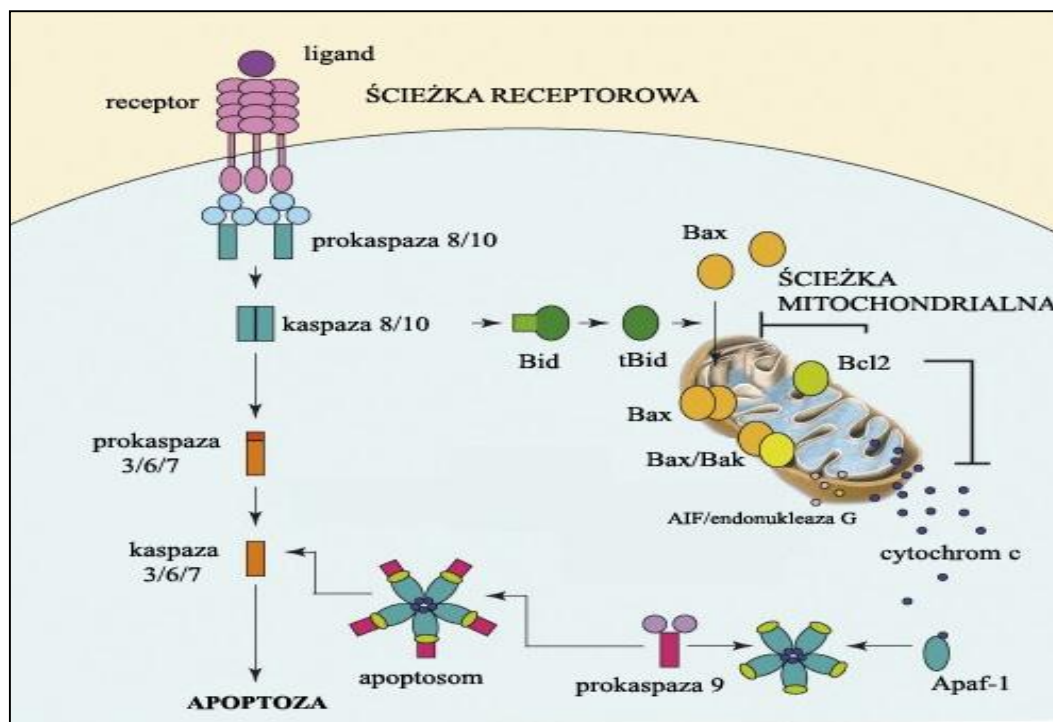
Teorię o roli zwiększonej produkcji ROS w patogenezie LHON, mogą również wspierać wyniki eksperymentów z inhibitorem kompleksu I, rotenonem, który poprzez zwiększanie produkcji ROS wywoływał apoptozę w analizowanych komórkach. Dowodem udziału ROS w tym procesie może być również fakt, że nadekspresja mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej w komórkach zwiększała ich oporność na apoptozę wywoływaną rotenonem (Li i wsp., 2003).

### **1.4.3 Apoptoza**

Apoptoza jest zaprogramowaną, ściśle regulowaną ścieżką śmierci komórkowej, niezbędną do utrzymania homeostazy komórkowej. Jest to proces czynny, wymagający aktywacji szeregu białek oraz nakładu dużej ilości energii, co odróżnia ją od biernego procesu nekrozy. Apoptozę charakteryzuje szereg zmian morfologicznych i metabolicznych komórek, do których można zaliczyć obkurczenie komórek, kondensację chromatyny z postępującą fragmentacją jądra komórkowego i kondensacją cytoplazmy, a w końcowej fazie z uwypukleniem błony komórkowej dochodzi do wytworzenia ciałek apoptotycznych zawierających struktury komórkowe przeznaczone do degradacji (Fulda i wsp., 2010).

### 1.4.3.1 Apoptoza zależna od kaspaz

Mozna wyróżnić dwie główne ścieżki śmierci apoptotycznej – zewnętrzną (receptorową) i wewnętrzną (mitochondrialną). Elementem łączącym i uruchamiającym oba szlaki jest aktywność charakterystycznych proteaz serynowych - kaspaz. Schemat apoptozy przedstawiono na rysunku 7.



**Rysunek 7. Schemat zewnętrznej i wewnętrznej ścieżki apoptozy** (Ramalho i wsp., 2007; zmodyfikowano).

Ścieżka zewnętrzna apoptozy aktywowana jest w momencie przyłączenia do receptora transbłonowego komórki odpowiedniego liganda (np. FasL, TRAIL czy TNF $\alpha$ ), co powoduje dołączanie kolejnych białek oraz aktywację kaspazy 8 aktywującej kaspazy wykonawcze, do których można zaliczyć kaspazy 3, 6 i 7 uruchamiające kolejne białka w kaskadzie i doprowadzające do apoptozy. Zewnętrzny szlak apoptozy z wewnętrznym łączy białko tBid powstałe w wyniku proteolizy przez kaspazę 2 i 8. Białko tBid jak również białka proapoptotyczne z rodziny Bcl-2 posiadające domenę BH3 (np. Bak, Bax) umożliwiają wypływ z mitochondriów cytochromu c, który w obecności dATP/ATP łączy się z czynnikiem APAF-1 formując apoptosom, do którego dołącza prokaspaza 9. Następnie prokaspaza 9 ulega aktywacji i uruchamia kolejne kaspazy wykonawcze, analogicznie jak ma to miejsce w ścieżce zewnętrznej. Oprócz cytochromu c z mitochondriów uwalniają się inne białka w tym AIF i endonukleaza G, które ulegają translokacji do jądra komórkowego (Acehan i wsp., 2002; Fulda i wsp., 2010; McIlwain i wsp., 2013).

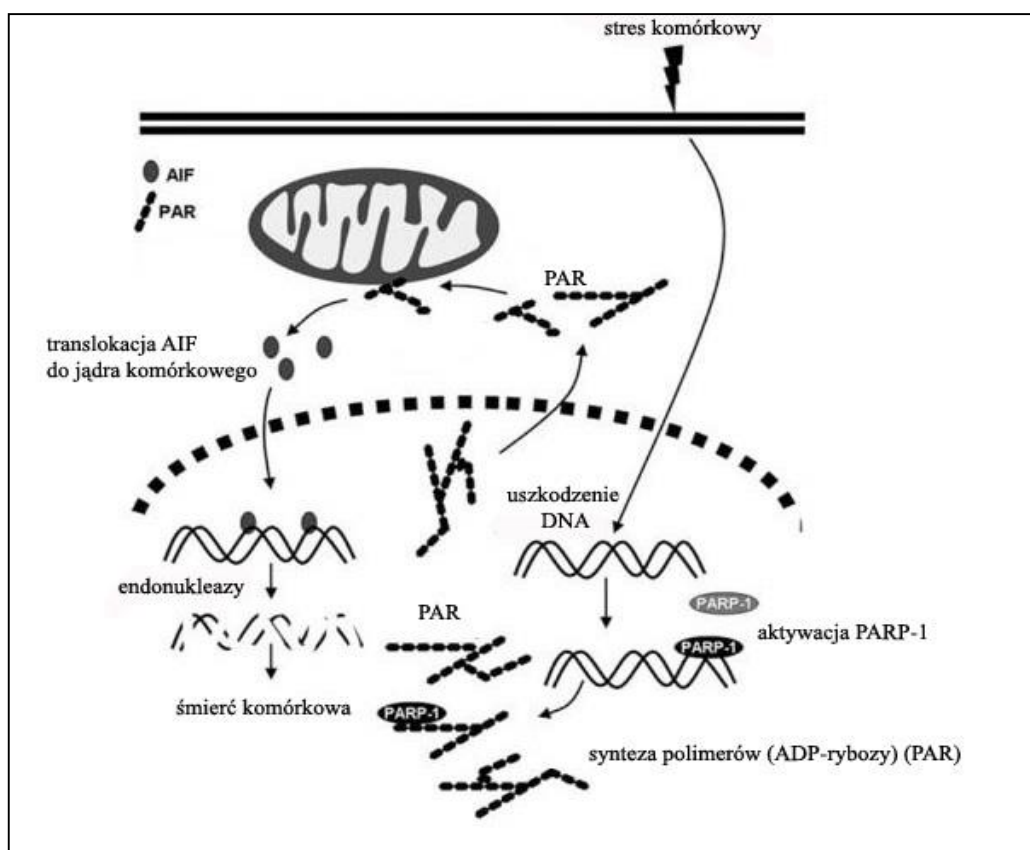
W badaniach na liniach komórkowych, analiza aktywności kaspaz wykonawczych 3 i 7 oraz degradacji ich substratów np. PARP-1, stanowi jeden z istotnych markerów indukcji apoptozy.

#### **1.4.3.2 Apoptoza zależna od PARP-1/AIF**

Polimeraza poli(ADP-rybozy)-1 (PARP-1) jest kluczowym enzymem jądrowym w wielu procesach fizjologicznych, ale jej podstawową rolą jest udział w procesach naprawy uszkodzeń DNA (Ko i Ren, 2012). W momencie aktywacji apoptozy, PARP-1 (116kDa) ulega proteolitycznemu cięciu głównie przez kaspazę 3 na dwa fragmenty o wielkości 89kDa i 27kDa, co jest jednym z markerów aktywacji kaspaz (Sen i Packer, 2002). Białko PARP-1 jest także cięte na fragmenty o innych wielkościach przez różne proteazy, a wzór cięcia charakteryzuje rodzaj śmierci zachodzący w komórce (Chaitanya i wsp., 2010). Proteolityczna inaktywacja PARP-1 w czasie indukcji apoptozy zapobiega zbyt intensywnemu zużyciu ATP przez PARP-1, a zmagazynowana energia jest niezbędna do przeprowadzenia wymagającego nakładu energii procesu apoptozy (D'Amours i wsp., 2001).

Niektóre eksperymenty wskazują, że mimo inhibicji kaspaz dochodzi do uwolnienia z mitochondrium czynnika indukującego apoptozę AIF jak jest to obserwowane w ścieżce wewnętrznej apoptozy zaindukowanej aktywnością kaspaz. AIF posiada dwie lokalizacje mitochondrialne. Jedna pula cząsteczek AIF lokuje się na błonie zewnętrznej, a druga w przestrzeni międzybłonowej w połączeniu z błoną wewnętrzną mitochondriów. Z racji posiadania hydrofobowego segmentu na N końcu białka, AIF zanim zostanie uwolnione do cytozolu musi zostać przekształcone w pełni hydrofilowe białko poprzez usunięcie tego segmentu (Yu i wsp., 2009). Translokacja AIF do jądra komórkowego uruchamia cykl przemian komórkowych prowadzących do śmierci komórki oraz ekspresji fenotypu apoptotycznego. Badania wykazały, że w uwalnianiu AIF z mitochondriów nie muszą pośredniczyć kaspazy, a proces ten może być zaindukowany aktywnością PARP-1 (Yu i wsp., 2002). Schemat aktywacji apoptozy zależnej od PARP-1 i AIF przedstawiono na rysunku 8.





**Rysunek 8. Schemat apoptozy zależnej od PARP-1/AIF** (Fatokun, 2011; zmodyfikowano).

Stres komórkowy wywołujący uszkodzenia DNA aktywuje PARP-1. PARP-1 wykorzystuje uzyskane w wyniku cięcia  $\text{NAD}^+$  cząsteczki ADP-rybozy do syntezy ich polimerów - poli(ADP-rybozy) (PAR), które poprzez wiązanie się do błony mitochondrialnej powodują jej depolaryzację i otwieranie megakanałów w niej zlokalizowanych, co doprowadza do uwalniania AIF i jego translokację do jądra komórkowego, a w konsekwencji do apoptozy niezależnej od kaspaz. Rola AIF w apoptozie polega prawdopodobnie na wiązaniu się z DNA i rekrutacji endonukleaz, w tym uwalnianej razem z AIF z mitochondrium endonukleazy G (Ye i wsp., 2002). Endonukleaza G przeprowadza degradację DNA do postaci nukleosomów, a współdziałając z egzonukleazami i DNazą I uczestniczy także w wysokocząsteczkowej degradacji DNA i aktywuje śmierć komórkową (Arnoult i wsp., 2003; Baek i wsp., 2013).

#### 1.4.4 Apoptoza w LHON

Za udziałem procesu apoptozy w degeneracji komórek zwojowych siatkówki w LHON przemawia fakt, że w przebiegu tej choroby nie obserwuje się zapalenia, a proces utraty wzroku jest bezbolesny (Kirches, 2011). Ponadto badania wskazują, że kompleks I łańcucha oddechowego jest zaangażowany w regulację otwierania mitochondrialnych megakanałów i aktywację apoptozy, dlatego mutacje LHON powiązane z podjednostkami tego kompleksu mogą wpływać na przebieg apoptozy (Carelli i wsp., 2004).



Analizy z udziałem cybryd z podstawowymi mutacjami LHON wykazały zwiększoną wrażliwość tych komórek na indukcję apoptozy zależnej od receptora Fas, a zważywszy na ekspresję tego receptora w siatkówce (Wahlsten i wsp., 2000), stanowiłoby to potwierdzenie udziału apoptozy w patogenezie tej choroby (Danielson i wsp., 2002).

Kolejne analizy z udziałem cybryd z mutacjami LHON wykazały także, że stres metaboliczny wywołany hodowlą z galaktozą, zmuszającą komórkę do produkcji ATP z łańcucha oddechowego, zwiększał ich śmiertelność powiązaną z uwolnieniem z mitochondriów cytochromu c w stosunku do linii cybryd kontrolnych, przy czym efekt ten był bardziej widoczny w komórkach z m.3460G>A niż z m.11778G>A (Ghelli i wsp., 2003). Mimo iż uzyskane wyniki wskazują, że w badanych cybrydach została zaindukowana apoptoza, to jednak dodatkowe analizy wykazały, że w komórkach tych uwolnienie cytochromu c było powiązane z wpływem AIF i endonukleazy G (Zanna i wsp., 2005), jednak proces ten nie był skorelowany z aktywacją kaspaz (Zanna i wsp., 2003, 2005). Oznacza to, że apoptoza w tych komórkach zaszła niezależnie od aktywności kaspaz, a zależnie od AIF, i jest możliwe, że translokacja AIF mogła zajść z udziałem PARP-1.

Za możliwym udziałem apoptozy niezależnej od kaspaz w przebiegu degeneracji komórek zwojowych siatkówki w LHON przemawiają także wyniki eksperymentów na liniach mysich komórek zwojowych siatkówki, gdzie zastosowanie inhibitorów kaspaz nie zapobiegło śmierci komórek, a ponadto nie zauważono w badaniu aktywacji kaspazy 3 (Carmody i Cotter, 2000).

#### **1.4.5 Autofagia**

Autofagia to silnie konserwowany ewolucyjnie od drożdży do człowieka wewnątrzkomórkowy system degradacji dysfunkcyjnych organelli i składników komórkowych jak białka, lipidy, cukry i RNA (Lee, 2012). Początkowo autofagia opisywana była jako mechanizm śmierci komórkowej, jednakże późniejsze badania wykazały, że ma ona w zasadzie działanie cytoprotekcyjne (Rosello i wsp., 2011). Można wyróżnić trzy typy autofagii: makroautofagię, mikroautofagię oraz autofagię zależną od białek opiekuńczych (CMA). W każdym z tych rodzajów autofagii dochodzi do degradacji komponentów komórkowych przez enzymy lizosomalne. Autofagia, często określana jako II typ programowanej śmierci komórkowej (Lee, 2012), jest utrzymywana w warunkach podstawowych jako mechanizm utrzymujący homeostazę komórkową, jak również może zostać zaindukowana w wyniku zadziałania czynników stresowych na komórkę, jak wzrost

ROS, deficyt składników odżywczych, uszkodzenie organelli komórkowych (Polewska, 2012).

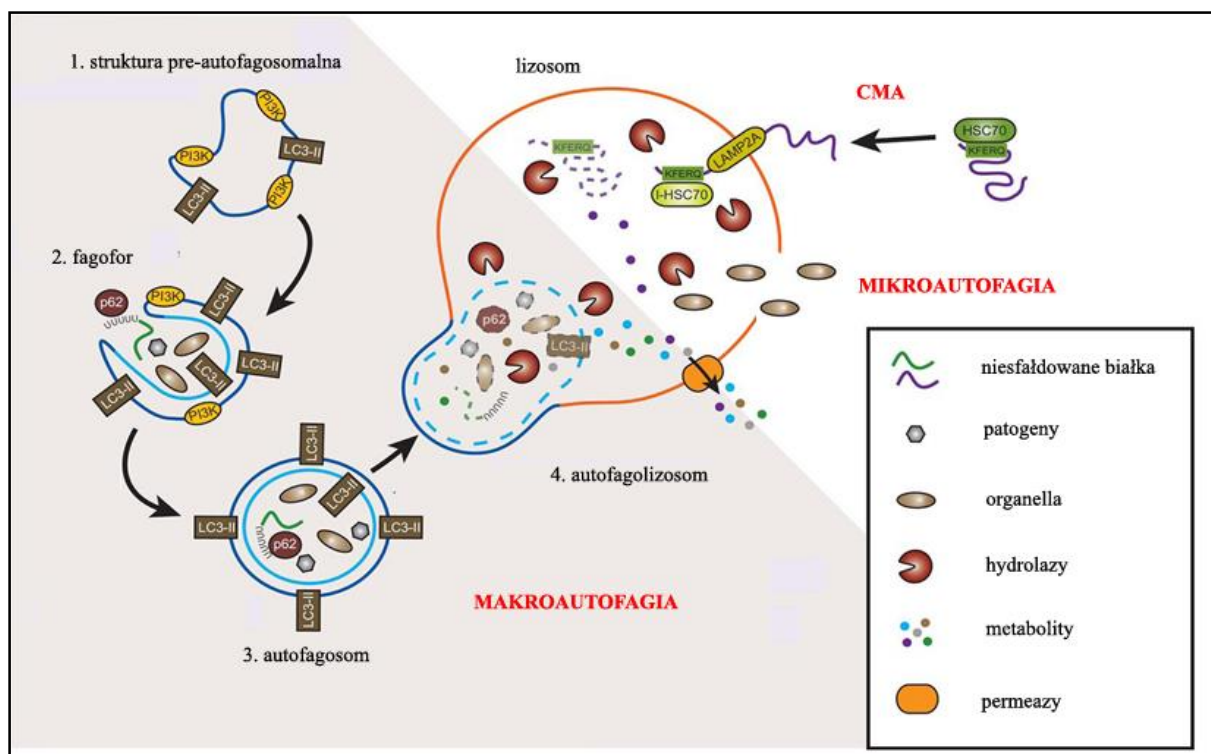
Makroautofagia jest najpowszechniejszą formą autofagii. Jej pierwszym etapem jest otaczanie komponentów komórkowych przeznaczonych do degradacji błoną w celu wytwarzania pęcherzyka autofagosomalnego - autofagosomu. Tworzenie autofagosomu wymaga rekrutacji szeregu specjalistycznych białek głównie z rodziny Atg. Istotnym białkiem inkorporowanym do wnętrza autofagosomu jest p62/*SQSTM1* (ang. *sequestosome-1*), którego zadaniem jest rekrutacja do autofagosomu naznaczonego ubikwityną materiału przeznaczonego do degradacji (Sahani i wsp., 2014). W następnych etapach następuje powolne zamykanie pęcherzyka okalającego materiał cytoplazmatyczny, a struktura autofagosomu przechodzi szereg etapów dojrzewania, a jednym z istotniejszych białek wbudowywanych w błonę autofagosomów jest białko MAP1-LC3, w skrócie LC3.

LC3 występuje w dwóch izoformach: cytozolowej-LC3-I (18kDa) i połączonej z błoną autofagosomu-LC3-II (16kDa). Cytozolowa forma białka LC3 powstaje poprzez trawienie białka pro-LC3, które poprzez kolejne modyfikacje z udziałem białek Atg i połączeniu z fosfatydyloetanolaminą (PE) tworzy formę autofagosomalną (LC3-II). LC3-II zostaje wbudowana do błony autofagosomów, dlatego poziom tego białka ściśle koreluje z ilością autofagosomów (Nikoletopoulou i wsp., 2015). LC3-II wchodzi także w interakcję z białkiem p62 pośrednicząc w transporcie substratów naznaczonych do degradacji. Białko p62 zostaje włączone do środka autofagosomu razem z komponentami komórkowymi, które mają być zdegradowane, i gdy z autofagosomem połączy się lizosom dochodzi do degradacji przez enzymy lizosomalne materiału wewnątrz autofagolizosomu, w tym białka p62, dlatego w miarę postępu autofagii zmniejsza się poziom białka p62 (Yu i wsp., 2008). Po degradacji materiału wewnątrz autofagosomu dochodzi do uwolnienia metabolitów, które mogą być ponownie użyte przez komórkę (Cherra i wsp., 2010).

Białka LC3 i p62 powszechnie określa się jako markery autofagii, a monitorowanie ich przemian umożliwia badanie tego procesu. Białko LC3-II jest markerem indukcji autofagii, a białko p62 jest markerem degradacji autofagolizosomów i sprawnie postępującej autofagii.

W mikroautofagii nie dochodzi do formowania się autofagosomu, a materiał przeznaczony do degradacji (np. organella komórkowe jak mitochondria) zostaje skierowany bezpośrednio do lizosomu. W autofagii zależnej od białek opiekuńczych degradowane są dysfunkcyjne białka, uszkodzone np. wyniku działania ROS. Białka przeznaczone do

degradacji eksponują na swojej powierzchni specyficzną sekwencję aminokwasową (motyw KFERQ) rozpoznawaną przez białko opiekuńcze Hsc70 i łącząc się z nim są transportowane poprzez interakcję z receptorem LAMP-2A do wnętrza lizosomów, gdzie są degradowane (Rosello i wsp., 2011). Przebieg procesu makroautofagii, mikroautofagii i autofagii zależnej od białek opiekuńczych przedstawiono na rysunku 9.



**Rysunek 9. Schemat trzech rodzajów autofagii: makroautofagii, mikroautofagii i autofagii zależnej od białek opiekuńczych (CMA).** Na rysunku wyodrębniono proces formowania się autofagolizosomów w procesie makroautofagii. Zaznaczono kolejne stadia formowania się autofagosomów od struktury preautofagosomalnej (1) poprzez fagofor (2) do dojrzałego autofagosomu (3), który łącząc się z lizosomem tworzy autofagolizosom (4), w którym dochodzi do degradacji komponentów autofagosomów. Na rysunku wyszczególniono ważne białka markerowe autofagii: LC3-II-wbudowywane w błonę autofagosomów i p62-biorące udział w transporcie materiału przeznaczonego do degradacji do wnętrza struktury autofagosomu (Jaeger i Wyss-Coray, 2009; zmodyfikowano).

Gdy dochodzi do degradacji ściśle określonych organelli komórkowych mówi się o autofagii selektywnej, do której można zaliczyć autofagię mitochondriów nazywaną mitofagią (Lee, 2012), która jest zainicjowana w momencie zaburzonej fosforylacji oksydacyjnej, wzrostu poziomu ROS lub gdy mitochondria są uszkodzone (Cheung i Ip, 2011).

Proces inicjacji autofagii u człowieka i innych ssaków kontrolowany przez szereg regulatorów, a szczególną rolę odgrywa kinaza serynowo-treoninowa mTor, a dokładnie kompleks 1 - mTORC1, złożony z kinazy mTor, która pełni funkcje katalityczne, oraz białek pomocniczych. mTORC1 poprzez fosforylację specyficznych białek zaangażowanych w indukcję autofagii uniemożliwia jej zapoczątkowanie. W przypadku wystąpienia stresu komórkowego, mTORC1 oddysocjowuje, białka ulegają defosforylacji i aktywacji, co umożliwia zapoczątkowanie formowania się autofagosomów (Polewska, 2012; Jung i wsp., 2010).

W przebiegu wielu chorób autofagia jest indukowana jako proces chroniący komórkę przed jej śmiercią poprzez usuwanie jej toksycznych komponentów. Zaburzenia tego procesu mogą wystąpić na różnych etapach - formowania, dojrzewania bądź degradacji autofagosomów. Szczególnie istotną rolę w zachowaniu homeostazy komórkowej pełni autofagia w komórkach neuronalnych (Cheung i Ip, 2011). Autofagia pełni ważną rolę w remodelowaniu i procesach regeneracyjnych aksonów, a jej zaburzenia prowadzą do zakłócenia transportu aksonalnego, obrzmienia aksonów i ich dystrofii (Lee, 2009).

Relacje między autofagią a apoptozą są złożone. Autofagia poprzez usuwanie toksycznych organelli i białek może stanowić mechanizm ratunkowy przed wprowadzeniem komórki na drogę śmierci apoptotycznej, stając się jednocześnie jej antagonistą. Autofagia wykrywana jest w momencie inhibicji apoptozy, gdyż białka uczestniczące w formowaniu autofagosomów jak Beclin1 i Atg4D są substratami do degradacji przez kaspazy. Z drugiej strony oba procesy działając jeden po drugim mogą doprowadzić do śmierci komórkowej. Udowodniono, że proteolityczna inaktywacja białek Beclin i Atg4D przez kaspazy hamuje autofagię, ale uzyskane po proteolizie peptydy mają możliwość indukcji wewnętrznej ścieżki apoptozy (Jain i wsp., 2013).

#### **1.4.6 Autofagia w LHON**

Rola autofagii w przebiegu LHON nie jest określona. Dotychczas w literaturze nie ma żadnych doniesień na temat wrażliwości komórek z mutacjami LHON na indukcję autofagii, jednak kilka faktów sugeruje, że proces ten może mieć istotne znaczenie w patofizjologii tej choroby.

Za zaangażowaniem procesu autofagii w śmierć komórek zwojowych siatkówki może przemawiać udowodnione naukowo zaburzenia tego procesu w innych chorobach neurodegeneracyjnych. W chorobie Parkinsona dochodzi do akumulacji w neuronach

agregatów  $\alpha$ -synukleiny, w chorobie Alzheimera obserwuje się złoże  $\beta$  amyloidu, a w komórkach mózgu chorych na Huntingtona akumuluje się zmutowana huntingtyna. Dla wszystkich tych chorób postuluje się udział zaburzonej autofagii. Obserwacje mikroskopowe tkanki mózgowej osób z chorobą Alzheimera i Parkinsona wykazały obecność akumulacji niedojrzałych autofagosomów, a w chorobie Huntingtona obserwowano niewydajną degradację autofagosomów i zaburzenia w selekcji komponentów przeznaczonych do degradacji (Rosello i wsp., 2011).

Degeneracja aksonów komórek nerwowych jest przyczyną wielu chorób neurologicznych jak udar, stwardnienie rozsiane, jaskra czy LHON (Li i wsp., 2001; Wang i wsp., 2012). W przypadku wielu chorób neurodegeneracyjnych dochodzi najpierw do degeneracji aksonów, a dopiero potem ciała komórek nerwowych. Proces ten łączy wiele wspólnych cech morfologicznych obserwowanych również w przekrojach nerwów takich jak obrzęk aksonów, destabilizacja mikrotubul i cytoszkieletu (Wang i wsp., 2012). Jednym z pierwszych objawów wyciszenia genu *Atg5* w komórkach Purkiniego transgenicznym myszy *pcp2-Cre* był obrzęk aksonów w których wykrywano akumulację autofagosomów. Taki wynik potwierdza istotną rolę autofagii w utrzymywaniu prawidłowej morfologii i fizjologii, szczególnie w tej części komórek nerwowych, a jej inhibicja prowadzi do obrzęku komórek i postępującej degeneracji (Nishiyama i wsp., 2007). Podobny obraz obrzękniętych aksonów obserwuje się również w przebiegu LHON, dlatego nie jest wykluczone, że w LHON również dochodzi do zaburzeń w procesie degradacji autofagosomów.

Podwyższony poziom mitofagii zaobserwowano w cybrydach z mutacjami w mitochondrialnym genie *tRNA<sup>Lys</sup>*, odpowiedzialnymi za chorobę mitochondrialną MERRF (De la Mata i wsp., 2012). Zwiększony poziom ekspresji genów związanych z autofagią zanotowano także w fibroblastach z mutacjami w genie kodującym *tRNA<sup>Leu</sup>*, odpowiedzialnym za wystąpienie choroby mitochondrialnej MELAS (Cotán i wsp., 2011). Jednakże, mimo zainicjowania autofagii w tych fibroblastach, zauważono zaburzenia degradacji autofagosomów oraz ich akumulację w komórkach. Co więcej, zahamowanie autofagii w komórkach fibroblastów z mutacjami MELAS zwiększyło w nich trzykrotnie poziom apoptozy, co sugeruje, że w komórkach tych autofagia, poprzez eliminację dysfunkcyjnych mitochondriów, miała działanie cytoprotekcyjne (Cotán i wsp., 2011).

Na protekcyjne działanie autofagii i jej silne zaangażowanie w homeostazę komórek nerwu wzrokowego wskazują eksperymenty na myszach. Badania nad autofagią wywołaną aksotomią nerwu wzrokowego u myszy wykazały, że inhibicja autofagii zmniejszała ilość

żywych komórek zwojowych siatkówki, co jednocześnie wskazywało na protekcyjną funkcję autofagii w trakcie uszkodzenia nerwu wzrokowego (Rodriguez-Muela i wsp., 2011). Nie jest wykluczone, że autofagia pełni taką samą funkcję w ludzkich komórkach zwojowych siatkówki, ale wyłącznie w przypadku, gdy zachodzi ona z pełną wydajnością i nie ulega zaburzeniu, na przykład w wyniku inhibicji na etapie tworzenia autofagolizosomów i ich degradacji.

Zwiększona mitofagia oraz śmierć komórek z mutacjami w genach mitochondrialnych kodujących tRNA oraz mysich komórek zwojowych siatkówki po zahamowaniu autofagii oznacza, że proces ten w komórkach z mutacjami mitochondrialnymi oraz w komórkach zwojowych siatkówki ma działanie cytoprotekcyjne, uniemożliwiające indukcję śmierci apoptotycznej i uszkodzeń wywołanych wzrostem poziomu ROS. Zaburzenia tego procesu, intensywna mitofagia oraz akumulacja autofagosomów zaburzają metabolizm komórkowy i skutkują śmiercią komórek. Takie wyniki wskazują, że w degenerujących komórkach zwojowych siatkówki z mutacjami w mtDNA odpowiedzialnymi za ekspresję LHON można się spodziewać podobnych zaburzeń procesu autofagii.

Zaburzenie procesu autofagii w komórkach zwojowych siatkówki mogłyby także tłumaczyć odmienną penetrację LHON u obu płci. Dowodów na tę tezę dostarczają eksperymenty na szczurzych neuronach poddanych głodzeniu, które wykazały różnice autofagii pomiędzy neuronami męskimi i żeńskimi, z wyższym poziomem autofagii i większą śmiertelnością komórek męskich (Du i wsp. 2009). Jeśli podobną sytuację zaobserwowano by w komórkach pacjentów z LHON, to zaburzona autofagia mogłaby być odpowiedzialna za wyższą śmiertelność męskich neuronów i zwiększoną częstość zachorowań na LHON wśród mężczyzn.

## 1.5. Modele komórkowe chorób mitochondrialnych

Większość objawów chorób mitochondrialnych związanych jest z dysfunkcją układu nerwowego, jednak trudno jest uzyskać komórki nerwowe do badań. Z tego powodu badania korelacji genotyp-fenotyp w chorobach mitochondrialnych opierają się na analizach linii komórkowych, wyprowadzonych z innych komórek ciała pacjentów oraz linii komórkowych skonstruowanych *in vitro*.

Najczęściej linie komórkowe pacjentów z chorobami mitochondrialnymi wyprowadza się z komórek krwi i bioptatów skóry. Wynika to ze względnej łatwości i małej inwazyjności



metody uzyskania materiału do wyprowadzenia hodowli (Cameron i wsp., 2004). W celu nieograniczonego dostępu do materiału badawczego, limfocyty B z komórek krwi unieśmiertelnia się wirusem Epsteina-Barr, a unieśmiertelnione linie limfocytów nazywa się limfoblastami (Brown i wsp., 2000). Linie komórkowe limfoblastów i fibroblastów skóry umożliwiają analizę komórek pacjentów z mutacjami mitochondrialnymi z uwzględnieniem wpływu tła jądrowego. Jednak aby wyeliminować modyfikujący metabolizm wpływ jądra komórkowego pacjentów, skonstruowano model transmitochondrialnych hybryd cytoplazmatycznych – cybrydy (Swerdlow, 2007).

Cybrydy to komórki powstałe poprzez fuzję komórek pozbawionych mtDNA z pozbawionymi jądra komórkami pacjentów posiadających mitochondria z mutacjami w mtDNA. Cybrydy są bardzo częstym modelem komórkowym stosowanym od początku lat 90 XX wieku do analizy wpływu mutacji mitochondrialnych na metabolizm komórek, pozwalającym wykluczyć modyfikujące tło jądrowe komórek pacjentów (Kirches, 2011; Khan i wsp., 2007).

Proces cybrydyzacji jest kilkuetapowy. W pierwszym etapie konstruuje się komórki pozbawione mtDNA, tak zwane komórki rho0 ( $\rho 0$ ). Komórki  $\rho 0$  powstają w wyniku długotrwałej hodowli z bromkiem etydy (EtBr). EtBr, który posiada ładunek dodatni preferencyjnie koncentruje się w ujemnie naładowanych mitochondriach i interkaluje do mtDNA zatrzymując jego replikację (Wilkins i wsp. 2014; Khan i wsp., 2007). W czasie przygotowań do cybrydyzacji komórki mające być donorami mitochondriów (komórki pacjentów z mutacjami w mtDNA) poddaje się enukleacji. Etap enukleacji można pominąć, jeśli donorami mitochondriów są bezjądrzaste płytki krwi (Khan i wsp., 2007). Enukleowane komórki donorowe, bądź płytki krwi, nazywa się cytoplastami. W następnym etapie dokonuje się fuzji między komórkami  $\rho 0$  a cytoplastami. Tak wyprowadzone komórki-cybrydy, posiadają jądra komórkowe komórek  $\rho 0$  oraz mitochondria z mtDNA od komórek donorowych (Schon i wsp., 2012).

Pierwszą, ludzką linię komórek  $\rho 0$  wyprowadzono z komórek osteosarkomy (linia  $\rho 0$  143B101 i 143B206) i na nich 26 lat temu przeprowadzono proces cybrydyzacji, a technikę tę stosuje się powszechnie do dnia dzisiejszego (King i Attardi, 1989). Późniejsze modyfikacje techniki dotyczyły zmian metody konstrukcji komórek  $\rho 0$  poprzez eliminację z procedury EtBr i wprowadzania dideksynukleozydów hamujących replikację mtDNA bądź stosowanie czynników hamujących mitochondrialną polimerazę  $\gamma$ . Deplecję mtDNA zauważono również w przypadku suplementacji hodowli komórek rodaminą 6-G (Khan i

wsp., 2007).

Oprócz komórek linii osteosarkomy, obecnie dostępnych jest komercyjnie szereg innych linii p0 wyprowadzonych z komórek HeLa, neuroblastomy, niedrobnokomórkowego raka płuc (A549) i wiele innych (Wilkins i wsp., 2014). Model cybrydowy szybko został zaadaptowany do analizy patogennego wpływu mutacji mitochondrialnych w przebiegu różnych chorób, badania wpływu heteroplazmii mtDNA na fizjologię komórek, określania progu patogenności mutacji i analizy kompatybilności między nDNA a mtDNA (Swerdlow, 2007).

W ostatnich latach próbuje się również zaadoptować do badania chorób mitochondrialnych indukowane komórki pluripotencjalne (iPSC). Wykorzystano je już między innymi do analizy rzadkiej choroby mitochondrialnej wywołanej delecjami w mtDNA, Zespołu Pearsona. W eksperymencie tym udało się wyprowadzić indukowane komórki pluripotencjalne z komórek somatycznych pacjenta, zreprogramować je i zróżnicować w kierunku komórek hematopoetycznych (Cherry i wsp., 2013). Procedura ta stwarza możliwość badania mutacji mitochondrialnych w konkretnym środowisku komórkowym, odzwierciedlającym tkankę, w której choroba się ujawnia. Dlatego iPSC mogą stać się przydatnym narzędziem do badania chorób o dużej specyficzności tkankowej, do których niewątpliwie należy LHON.



---

## **2. CELE PRACY**

Badania w ramach rozprawy doktorskiej miały na celu przeprowadzenie analiz genetycznych i biochemicznych komórek pacjentów polskiej rodziny z rzadką kombinacją dwóch mutacji mitochondrialnych m.11778G>A i m.3460G>A odpowiedzialnymi za wystąpienie LHON, jak również poszukiwanie nowych wariantów mutacji odpowiedzialnych za wystąpienie tej choroby. W szczególności w badaniach skupiono się na:

- Poszukiwaniu mutacji mitochondrialnych u osób ze zdiagnozowanym zanikiem nerwu wzrokowego, ale u których analizy genetyczne wykluczyły obecność podstawowych mutacji odpowiedzialnych za ekspresję LHON.
- Wyprowadzeniu modeli komórkowych do badania metabolizmu komórek z mutacjami LHON i porównanie ich z komórkami bez mutacji mitochondrialnych.
- Zbadaniu wybranych parametrów biochemicznych w komórkach z mutacjami LHON oraz bez mutacji mitochondrialnych – analiza apoptozy, autofagii, produkcji wolnych rodników tlenowych, poziomu transkryptów, oddychania komórkowego.
- Ocenie efektów mutacji LHON w zastosowanych modelach komórkowych i weryfikacji niektórych z hipotez dotyczących przyczyn choroby.

### **3. MATERIAŁY I METODY**

Przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej badania uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (KB/183/2012).

#### **3.1 MATERIAŁY**

##### **3.1.1 Pacjenci i ich charakterystyka**

- **Rodzina z dwiema mutacjami LHON**

W 2005 roku troje braci trafiło na Oddział Okulistyczny Szpitala Uniwersyteckiego w Warszawie z podejrzeniem LHON. W 2000 r. pacjent III-1 (p.1) w wieku 27 lat zaczął skarżyć się na pogorszenie jakości widzenia najpierw w lewym, a następnie prawym oku. U pacjenta III-3 (p.3) nagła utrata wzroku wystąpiła przed 26 rokiem życia (dokładny wiek nieznan), podobnie jak u jego brata najpierw w jednym potem w drugim oku. U pacjenta III-6 (p.6) nagła utrata wzroku wystąpiła w wieku 20 lat. Badanie dna oka u trojga braci wykazało bladość tarczy nerwu wzrokowego, zwężenie naczyń krwionośnych oraz degenerację nerwu wzrokowego. Matka pacjentów (II-1) (p.1) oraz ich siostra (III-5) (p.5) wykazywały normalną ostrość widzenia i nie miały symptomów degeneracji nerwu wzrokowego. Wszyscy trzej mężczyźni byli palaczami.

W 2008 r. na oddział okulistyczny tego samego szpitala trafiło kolejnych dwóch mężczyzn z tej rodziny III-2 i III-7. Pacjent III-2 (p.2) zaczął tracić wzrok w prawym oku w wieku 20 lat, a objawy wystąpiły w drugim oku sześć miesięcy później. Pacjent III-7 (p.7) zaczął tracić wzrok trzy miesiące wcześniej zanim trafił do Szpitala Uniwersyteckiego w Warszawie (w wieku 36 lat), a utrata wzroku u tego pacjenta nastąpiła najpierw w prawym oku, a po dwóch miesiącach pogorszenie widzenia zdiagnozowano w lewym oku. Nie dysponowano danymi dotyczącymi charakterystyki diagnostycznej pacjenta III-4 (p.4), wiadomo jedynie, że zachorował on w wieku 25 lat. Żaden z pacjentów nie wykazywał żadnych dodatkowych zaburzeń neurologicznych poza utratą wzroku. Badania genetyczne przeprowadzone w 2008 r. przez Marzenę Kurzawę na DNA wyizolowanym z komórek krwi wykazały u wszystkich objawowych mężczyzn oraz bezobjawowej siostry i ich matki obecność dwóch mutacji odpowiedzialnych za wystąpienie LHON: m.11778G>A oraz m.3460G>A. W trakcie wykonywania niniejszej pracy doktorskiej otrzymano próbki

krwi oraz biopsaty skóry od pięciu z sześciorga wyżej opisanych objawowych pacjentów oraz ich zdrowej siostry. Rodowód rodziny z dwiema mutacjami LHON m.11778G>A oraz m.3460G>A wraz z zaznaczeniem probandów ujętych w kolejnych analizach przedstawiono na rysunku 18 w rozdziale Wyniki. Otrzymano również próbki krwi w celu wyprowadzenia linii komórkowej niespokrewnionej z probandami z rodziny z dwiema mutacjami LHON innej, żeńskiej bezobjawowej pacjentki (w analizach określana jako 1 MUT). Pacjentka ta posiadała tylko jedną mutację w pozycji m.11778G>A. Charakterystykę pacjentów z dwiema mutacjami LHON m.11778G>A i m.3460G>A poddanych analizie w ramach niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono w tabeli 2.

**Tabela 2. Charakterystyka pacjentów ujętych w analizach** (Tońska i wsp, 2008).

pacjent	pleć	rok urodzenia	wiek zachorowania (lata)	status chorobowy
p.1	mężczyzna	1978	27	chory nosiciel
p.3	mężczyzna	1980	przed 26	chory nosiciel
p.4	mężczyzna	1980	25	chory nosiciel
p.5	kobieta	brak danych	zdrowa	zdrowa nosicielka
p.6	mężczyzna	1985	20	chory nosiciel
p.7	mężczyzna	1973	36	chory nosiciel

Wszyscy pacjenci wyrazili świadomą zgodę na wykorzystanie pobranych tkanek w celach badań naukowych. Materiał od pacjentów uzyskano w ramach współpracy z Katedrą i Kliniką Okulistyki Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

- **Pacjent 1 z zanikiem nerwu wzrokowego o nieznanej etiologii**

Probandem był 17-letni mężczyzna z objawami zaniku nerwu wzrokowego o nieznanej etiologii, u którego podstawowa diagnostyka genetyczna na DNA wyizolowanym z krwi wykluczyła obecność trzech podstawowych mutacji wywołujących LHON (m.11778G>A, m.3460G>A, m.14484T>C). W wieku 16 lat u probanda zaobserwowano drastyczne pogorszenie ostrości widzenia w lewym oku, a po dwóch miesiącach w prawym oku. Badanie wykazało obrzęk i przekrwienie tarczy nerwu wzrokowego, a optyczna koherentna tomografia dna oka potwierdziła obustronną atrofię nerwu wzrokowego, będącą

charakterystycznym objawem dla LHON. Rodowód rodziny probanda przedstawiono na rysunku 12 w rozdziale Wyniki, a probanda oznaczono strzałką. Proband posiada troje młodszego, bezobjawowego rodzeństwa. Degenerację nerwu wzrokowego zdiagnozowano także u kuzyna probanda (pacjent IV-8), brata matki probanda (pacjent III-8 na rodowodzie), dwóch braci babci probanda (pacjenci II-1 i II-2 na rodowodzie) oraz u dwóch siostrzeńców babci probanda (pacjenci III-3 i III-4 na rodowodzie). Analizę genetyczną w celu poszukiwania mutacji mitochondrialnych odpowiedzialnych za zanik nerwu wzrokowego w tej rodzinie przeprowadzono na DNA wyizolowanym z krwi probanda, jego kuzyna oraz bezobjawowej matki probanda oznaczonych na rodowodzie kolejno IV-11, IV-8 i III-12.

- **Pacjent 2 z zanikiem nerwu wzrokowego z towarzyszącymi objawami neurologicznymi o nieznanej etiologii**

Probandem (oznaczony strzałką na rodowodzie przedstawionym na rysunku 15 w rozdziale Wyniki) był 24-letni mężczyzna. W wieku 22 lat u pacjenta pojawiły się ataki drgawek, mioklonie, występowały u niego również ataksje i dystonie. W styczniu 2009 r. został przyjęty na Oddział Neurologii Szpitala Uniwersyteckiego w Gdańsku, gdzie wykluczono u niego stwardnienie rozsiane oraz zespół antyfosfolipidowy. W kwietniu 2009 r. pacjent trafił na Oddział Neurologii Szpitala Uniwersyteckiego w Warszawie. Leczenie lekami przeciwdrgawkowymi (walproinian sodu i Okskarbazepina) nie poprawiło stanu zdrowia pacjenta. Zastosowanie leku Levetiracetam zredukowało objawy mioklonii. Badanie EEG dało obraz charakterystyczny dla pacjenta z padaczką. Badanie okulistyczne wykazało obniżenie reakcji na światło i zanik nerwu wzrokowego w obu oczach. Pacjent ma dwóch młodszych, bezobjawowych braci (oznaczonych III-9 i III-10 na rodowodzie przedstawionym na rysunku 15 w rozdziale Wyniki), bezobjawowa była również matka pacjenta (oznaczona na rodowodzie II-8). Analizę genetyczną w celu poszukiwania mutacji mitochondrialnych odpowiedzialnych za zanik nerwu wzrokowego u badanego probanda przeprowadzono w pierwszej kolejności na DNA z krwi probanda i jego matki.

### **3.1.2 Charakterystyka grupy kontrolnej**

Grupę kontrolną stanowiły osoby powyżej 18 roku życia obojga płci, od których pobrano próbki krwi i biopsję skóry. Próbki krwi pobrano od 5 osób, którzy byli studentami i doktorantami Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Biopsaty skóry pobrane od 8 osób podczas zabiegów chirurgii plastycznej, usuwania znamion lub zmian nowotworowych skóry pochodziły z następujących ośrodków klinicznych:

- Centrum Onkologii Instytut im. Marii Skłodowskiej Curie w Warszawie
- Klinika Chirurgii Plastycznej i Medycyny Estetycznej SFERA w Warszawie

Wszystkie osoby wyraziły świadomą zgodę na wykorzystanie pobranych od nich tkanek do badań naukowych. Charakterystykę grupy kontrolnej, od której pochodziły próbki krwi i biopsaty skóry, które posłużyły do wyprowadzenia linii komórkowych przedstawiono w tabeli 3.

**Tabela 3. Charakterystyka grupy kontrolnej.**

rodzaj próbki	numer kontroli	pleć	wiek (lata)
krew	lk.1	mężczyzna	21
	lk.2	mężczyzna	21
	lk.3	mężczyzna	21
	lk.4	kobieta	30
	lk.5	kobieta	26
biopsaty skóry	fk.1	mężczyzna	50
	fk.2	mężczyzna	52
	fk.3	mężczyzna	36
	fk.4	kobieta	35
	fk.5	kobieta	20
	fk.6	kobieta	25
	fk.7	kobieta	27
	fk.8	mężczyzna	30

### **3.1.3 Stosowane linie komórkowe**

Biopsaty skóry posłużyły do wyprowadzenia linii fibroblastów i skonstruowania transmitochondrialnych hybryd cytoplazmatycznych (cybryd). Linie kontrolne fibroblastów otrzymano od dr Aleksandry Sołygi, pozostałe linie komórkowe zostały skonstruowane

samodzielnie lub we współpracy ze studentami, którymi autor pracy opiekował się podczas wykonywania niniejszej pracy doktorskiej. Do eksperymentów genetycznych i biochemicznych wykorzystano 6 z 8 wyprowadzonych linii fibroblastów i cybryd, oznaczonych w tabeli 4 symbolami od fk.1 - fk.6. Próbkę krwi pobrane od pacjentów i osób z grupy kontrolnej posłużyły do wyprowadzenia linii komórkowej unieśmiertnionych limfocytów B. Procedurę wyprowadzania poszczególnych linii komórkowych przeprowadzano w sterylnych warunkach pod laminarem Nuair LabGard NU-437.

Do konstrukcji cybryd wykorzystano komercyjnie dostępną linię komórkową p0 143B, którą uzyskano od dr Łukasza Borowskiego z Instytutu Genetyki i Biotechnologii Uniwersytetu Warszawskiego. Charakterystykę linii komórkowej p0 143B przedstawiono w tabeli 4.

**Tabela 4. Charakterystyka linii komórkowej p0 143B** (źródło: Public Health England/Culture Collections oraz The Global Bioresource Center ATCC).

<b>nazwa linii</b>	<b>143B TK<sup>-</sup> Rho0</b>			
<b>pochodzenie</b>	<b>Homo sapiens, rasa kaukaska, kobieta 13 lat</b>			
<b>źródło biologiczne</b>	<b>kość, osteosarkoma</b>			
<b>cechy linii komórkowej</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• całkowita deplecja mtDNA</li> <li>• brak aktywności kinazy tymidynowej (TK<sup>-</sup>)</li> <li>• oporność na bromodeoksyurydynę (BrdU<sup>-</sup>)</li> <li>• hodowla adherentna</li> </ul>			
<b>profil genetyczny (STR)</b>	<b>CSF1PO:12</b> <b>D7S820:11,12</b>	<b>D13S317:12</b> <b>TH01:6</b>	<b>D16S539:10,13</b> <b>TPOX:11</b>	<b>D5S818:13</b> <b>vWA:18</b>

### 3.1.4 Warunki hodowli

Hodowle linii komórkowych były prowadzone w inkubatorze Nuair AutoFlow 5510 Direct Heat CO<sub>2</sub> Incubator NU-5510 w sterylnych warunkach w temperaturze 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Skład podłoża standardowego (pożywek) dla komórek z linii limfoblastów, linii małych leukocytów B95-8 oraz dla komórek z linii fibroblastów, cybryd i komórek z linii p0 143B przedstawiono w tabeli 5.

**Tabela 5. Skład podłoża do hodowli komórek z linii limfoblastów , małych leukocytów B95, fibroblastów, cybryd i komórek z linii ρ0 143B.**

odczynnik	limfoblasty, małe leukocyty B95-8 (zawartość)	fibroblasty, cybrydy/ ρ0 143B (zawartość)
medium hodowlane	(RPMI, 1640) (GIBCO®)  (70%)	medium hodowlane (DMEM, glukoza 4,5g/l + L-glutamina) (GIBCO®) (70%)
FBS (GIBCO®, heat inactivated)	10%	10%
pirogonian sodu (GIBCO®)	1mM	1mM/2,5mM
urydyna ( Sigma-Aldrich)	0,05mg/ml	0,05mg/ml
penicylina/streptomycyna ( Sigma-Aldrich)	1%	1%
bufor HEPES (GIBCO®)	1%	brak

W warunkach eksperymentalnych hodowle uzupełniano różnymi dodatkami. W warunkach hodowli na galaktozie stosowano pożywki RPMI1640 bez glukozy (GIBCO®) dla limfoblastów i DMEM/F12 bez glukozy (GIBCO®) dla fibroblastów i cybryd. Pożywki te uzupełniano D-galaktozą (Sigma-Aldrich) w końcowym stężeniu 5mM. W warunkach hodowli z rotenonem standardowe pożywki z glukozą suplementowano rotenonem (Sigma-Aldrich), tak, aby stężenie końcowe wyniosło 2,5μM.

## 3.2 METODY

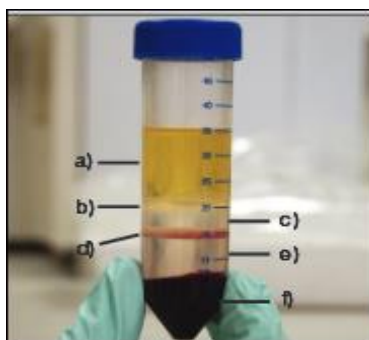
### 3.2.1 Wyprowadzanie linii komórkowych

- **Wyprowadzanie linii komórkowych limfoblastów**

Linie komórkowe limfoblastów wyprowadzano poprzez unieśmiertelnianie wirusem Epsteina-Barr wyizolowanych z krwi komórek mononuklearnych. Wirus ten preferencyjnie infekuje limfocyty B, dlatego właśnie te komórki ulegają unieśmiertelnieniu.

Wirus Epsteina-Barr (EBV) stosowany do unieśmiertelniania limfocytów B otrzymywano w wyniku hodowli zainfekowanych tym wirusem małych leukocytów krwi linii B95-8 (linia wyprowadzona od tamaryny białoczubej ang. *marmoset cell line B95-8*) w kompletnej pożywce RPMI-1640 o składzie podanym w tabeli 5. W trakcie hodowli tych komórek wirus był uwalniany do pożywki. W celu uzyskania wysokiego stężenia wirusa w pożywce, komórkom zmieniono pożywkę na świeżą i pozostawiono na 4 dni. Po tym czasie komórki linii B95-8 wirowano, a supernatant z nad peletu komórkowego zbierano i filtrowano przez filtry o porach  $0,45\mu\text{m}$  (Millipore). Przefiltrowaną pożywkę z EBV przechowywano w zamrażarce w  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Do wyprowadzenia i unieśmiertelnienia komórek krwi wykorzystano krew pobraną do probówek z cytrynianem sodu. 3-5ml krwi dokładnie wymieszano poprzez obracanie probówki po czym przenoszono ją do probówek wypełnionych medium rozdzielającym Ficoll-Paque<sup>TM</sup>PLUS (probówki Leucosep® 163288, Greiner bio-one) i wirowano 800g/15min w temperaturze pokojowej (RT). Po wirowaniu otrzymano warstwy roztworu przedstawione na rysunku 10:



**Rysunek 10.** Warstwy otrzymane w wyniku wirowania krwi w gradiencie fikolu w probówkach Leucosep® 163288 (Greiner bio-one). Opis warstw: (a) osocze, (b) limfocyty i komórki mononuklearne, (c) medium separujące, (d) warstwa porowata, (e) medium separujące, (f) osad złożony z granulocytów i erytrocytów.



Z tak rozdzielonej krwi delikatnie usuwano warstwę osocza i pobierano pipetą Pasteura warstwę komórek mononuklearnych do nowej probówki typu Falcon, dodawano 10ml PBS (Sigma-Aldrich) i wirowano 10min/250g. Czynność wykonano dwukrotnie. W międzyczasie przygotowywano roztwór cyklosporyny A (Sigma-Aldrich). Cyklosporynę A rozpuszczano w alkoholu absolutnym, aby otrzymać roztwór wyjściowy o stężeniu 1mg/ml. W celu otrzymania roztworu roboczego cyklosporyny A rozcieńczono roztwór wyjściowy cyklosporyny A w kompletnej pożywce RPMI-1640 w proporcji 1:50 (cyklosporyna A:RPMI-1640). Osad komórkowy rozpuszczano w 4ml kompletnej pożywki RPMI-1640 (skład pożywki – tabela 5), następnie dodawano 1ml uprzednio przygotowanego supernatantu z EBV oraz 50µl roztworu roboczego cyklosporyny A. Gotową mieszaninę umieszczano w 25cm<sup>3</sup> butelce hodowlanej z filtrem (Nunc) i umieszczano w inkubatorze w 37°C i 5% CO<sub>2</sub> i nie zaglądano do niej przez 8 dni. Ósmego dnia dodawano do hodowli kolejne 50µl roztworu roboczego cyklosporyny A i zostawiano hodowlę na kolejne 7 dni. Po tym czasie dodawano do hodowli 3ml świeżej pożywki i pozostawiano w inkubatorze na 0,5 godziny w celu sedimentacji komórek. Po tym czasie usuwano taką samą ilość pożywki i dodawano kolejne 50µl roztworu roboczego cyklosporyny A. Po 48 godzinach, jeśli pożywka była żółta wymieniano jej część na świeżą. Po dwóch tygodniach od dnia przeprowadzenia transformacji komórek krwi EBV powinny w hodowli być zauważalne grudki zlepionych, unieśmiertelnionych limfocytów B (limfoblastów), co świadczy o udanej transformacji. W zależności od tempa wzrostu hodowli, pożywkę wymieniano co 2-3 dni.

- **Wyprowadzanie linii komórkowych fibroblastów**

Linie komórkowe fibroblastów wyprowadzano z biopłatów skóry dwiema metodami – metodą enzymatyczną i metodą „spielzania fibroblastów ze skrawków skóry właściwej”.

- **Wyprowadzanie linii komórkowych fibroblastów metodą enzymatyczną**

Biopłaty skóry obejmowały skórę właściwą, naskórek oraz fragmenty tkanki podskórnej z tkanką tłuszczową. Biopłaty skóry przed izolacją fibroblastów przechowywano w 4°C, w sterylnym buforze PBS (Sigma-Aldrich) z dodatkiem antybiotyków (Sigma-Aldrich, 10000 jednostek/ml penicyliny, 10 mg/ml siarczanu streptomycyny). Biopłaty skóry najpierw dwukrotnie płukano sterylnym PBS, a następnie rozdzielano na naskórek, skórę właściwą i fragmenty tkanki podskórnej przy użyciu sterylnych pęset

i skalpeli. Naskórek i tkankę podskórną usuwano, a skórę właściwą rozdzielano na drobne skrawki, które przenoszono do roztworu składającego się z 2 mg/ml kolagenazy (Sigma-Aldrich) i 0,1 mg/ml DNazy (Sigma-Aldrich) rozpuszczonych w pożywce DMEM [Invitrogen, glukoza (4,5 g/l), L-glutamina (4 mM), z dodatkiem antybiotyków (Sigma-Aldrich, 10000 jednostek/ml penicyliny, 10 mg/ml siarczanu streptomycyny), pirogronianu sodu (1mM) oraz urydyny (0,05mg/ml), w celu utrzymania komórek z dysfunkcjami kompleksu I łańcucha oddechowego w hodowli)]. Roztwór z enzymami rozpuszczonymi w pożywce, który pozwalał na uwolnienie się fibroblastów ze skrawków skóry właściwej, przechowywano w sterylnej, zamkniętej probówce typu Falcon w inkubatorze w 37°C, 5% CO<sub>2</sub> przez 16 godzin. Po 16 godzinach pożywkę z uwolnionymi fibroblastami przenoszono do 25cm<sup>3</sup> butelek hodowlanych z filtrem (Nunc) zawierających świeżą pożywkę DMEM (Gibco) suplementowaną 20% FBS (Gibco), antybiotykami (Sigma-Aldrich, 10000 jed./ml penicyliny, 10 mg/ml siarczanu streptomycyny), 5mM pirogronianem sodu i urydyną (0,05mg/ml). Hodowlę z 20% FBS prowadzono przez 48 godzin, po czym wymieniano pożywkę na świeżą zawierającą 10% FBS, w której prowadzono dalszą hodowlę. Pożywkę wymieniano co 2 dni, a po osiągnięciu 70% konfluencji fibroblasty pasażowano. Kolejna pasaż fibroblastów prowadzono w butelkach 75cm<sup>3</sup> (Nunc) lub szalkach 100mm (Greiner bio-one).

- **Wyprowadzanie linii komórkowych fibroblastów metodą „spelniania fibroblastów ze skrawków skóry właściwej”**

Pobrane biopaty skóry płukano dwukrotnie sterylnym PBS i rozdzielano na naskórek, skórę właściwą i tkankę podskórną przy użyciu sterylnych pęset i skalpeli. Naskórek i tkankę podskórną usuwano, a skórę właściwą rozdzielano na drobne skrawki, które układano w odstępach około 1cm na 100mm szalkach hodowlanych. Ułożone na szalkach skrawki skóry pozostawiano na kilka minut w nieprzykrytej wieczkiem szalce w laminarnym przepływie powietrza w celu ich wysuszenia i umożliwienia im przyczepienia się do szalki. Po kilku minutach na przyklejone do szalek skrawki skóry delikatnie nakraplano pełną pożywkę hodowlaną o składzie identycznym jak opisano w tabeli 5 (ale z 20% FBS), tak aby zapobiec przesunięciu się przyklejonych skrawków. Jeśli skrawek skóry odklejał się od szalki pobierano go sterylną pipetą pasteurą, przemywano PBS, przyklejano do nowej szalki i ponownie suszono kilka minut. Po napipetowaniu kilku kropel pożywki na skrawki skóry

następnie dodawano delikatnie kolejne 4ml pożywki, przykrywano szalki wieczkiem i wstawiano do inkubatora do 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Nie ruszano szalek przez kolejne 4 dni. Po tym czasie analizowano szalki pod mikroskopem. Po 4 dniach obserwowano pojedyncze fibroblasty rosnące wokół skrawków skóry, z której „spelzły”. Do hodowli dodawano 2ml świeżej pożywki, a po tygodniu wymieniano całą pożywkę na świeżą. Po 2-3 tygodniach komórki pasażowano. W czasie pasażu trypsynę nakraplano na fibroblasty z ominięciem skrawków skóry. Odklejone fibroblasty zbierano sterylną pipetą i pasażowano, natomiast na przyklejone skrawki skóry nakraplano pożywkę w celu umożliwienia uzyskania kolejnych fibroblastów. Kolejne pasaże prowadzono w pełnej pożywce DMEM z 10% FBS w butelkach 75cm<sup>3</sup> (Nunc) lub szalkach 100mm (Grainer bio-one).

- **Wyprowadzanie linii komórkowych transmitochondrialnych hybryd cytoplazmatycznych (cybryd)**

Linie komórkowe cybryd konstruowano poprzez fuzję komórek pozbawionych jądra komórkowego (enukleowanych fibroblastów, tzw. cytoplastów) z komórkami pozbawionymi mitochondrialnego DNA – komórki p0 (rho0). Wyprowadzone linie transmitochondrialnych hybryd cytoplazmatycznych (cybryd) posiadają tło jądrowe komórek p0 oraz mitochondria z mtDNA pochodzące z cytoplastów.

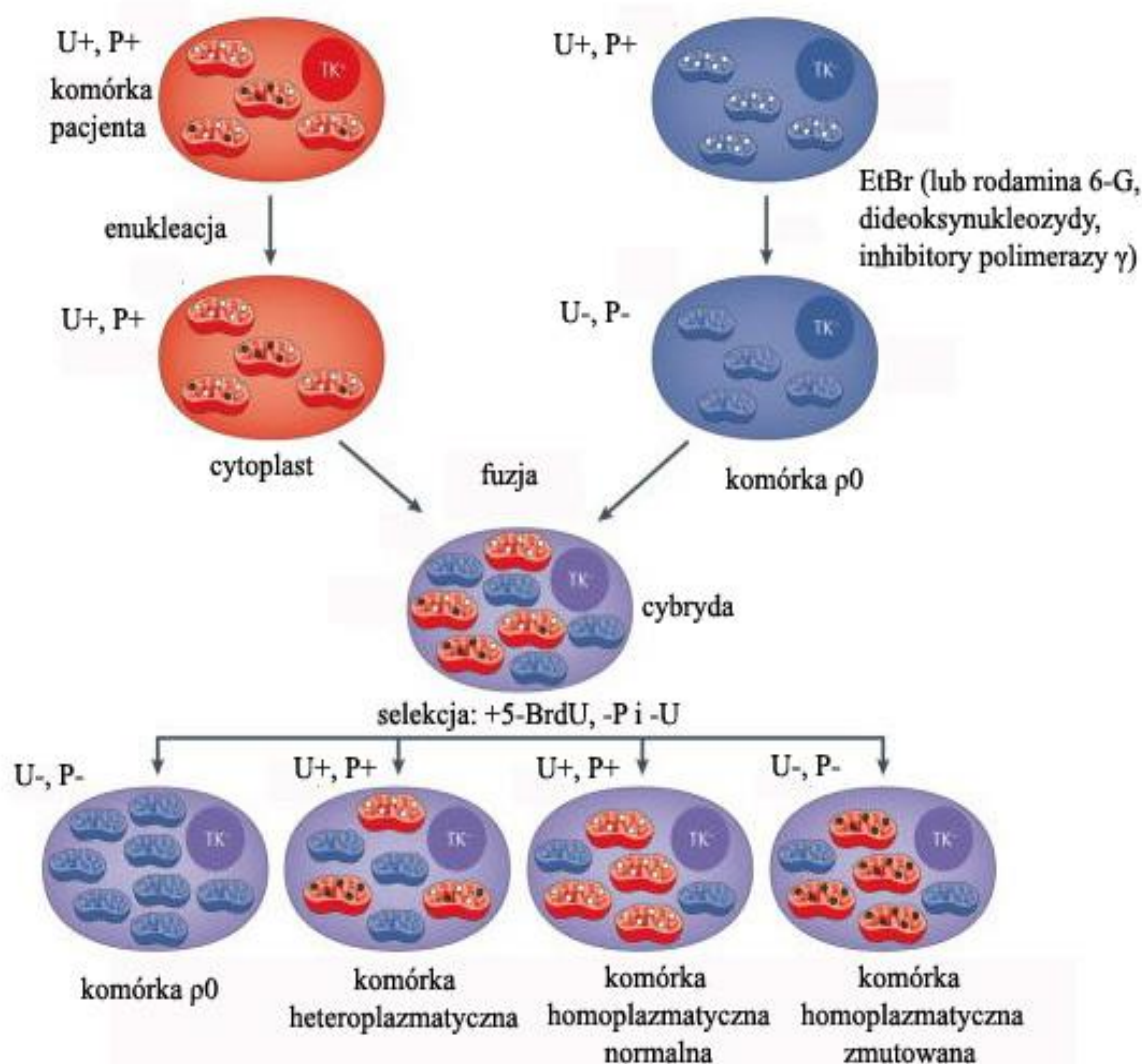
- **Enukleacja fibroblastów**

Pierwszym etapem konstrukcji cybryd jest uzyskanie komórek będących donorami mitochondriów. W niniejszej pracy komórkami donorowymi mitochondriów były enukleowane chemicznie fibroblasty. Do enukleacji fibroblastów wykorzystano aktynomycynę D (Sigma-Aldrich), która interkalując między nici DNA hamuje ich replikację i transkrypcję (Bayona-Bafaluy, 2003). Procedura enukleacji fibroblastów przebiegała następująco: na szalce rozsiewano 0,3x10<sup>6</sup> fibroblastów, dodawano pełnej pożywki DMEM (skład pożywki w tabeli 5) i aktynomycyny D w końcowym stężeniu 2µg/ml. Fibroblasty inkubowano w pożywce z aktynomycyną D przez 24 godziny.

- **Fuzja enukleowanych fibroblastów z komórkami p0 143B**

Procedura fuzji enukleowanych fibroblastów (cytoplastów) z komórkami p0 143B przebiegała kilkietapowo. W pierwszej kolejności po 24 godzinnej hodowli fibroblastów z aktynomycyną D odciągano pożywkę, przemywano hodowlę trzykrotnie pełną pożywką DMEM w celu odplukania aktynomycyny D i pozostawiono w kompletnej pożywce na 10min w inkubatorze. W międzyczasie odklejano komórki linii p0 143B, przepłukiwano PBS i zawieszano 1,5mln komórek w 2,5ml pełnej pożywki DMEM. Następnie odciągano pożywkę z fibroblastów i dodawano 2,5ml pożywki DMEM z komórkami p0 143B i wkładano do inkubatora na 3 godziny w celu umożliwienia komórkom p0 143B przyklejenia się do podłoża i wejścia w kontakt z enukleowanymi fibroblastami. W tym czasie przygotowywano roboczy roztwór glikolu polietylenowego (PEG, Sigma-Aldrich). 4,7g PEG przesypywano do probówki typu Falcon, którą umieszczano w gorącej wodzie, w celu umożliwienia rozpuszczenia się PEG. Gdy PEG się rozpuścił dodawano do niego 4ml czystego DMEM bez dodatków oraz 1ml dimetylosulfotlenku (DMSO, Sigma-Aldrich). Po 3 godzinach inkubacji fibroblastów z komórkami p0 143B usuwano pożywkę, przemywano trzykrotnie czystym DMEM bez dodatków i dokładnie usuwano pożywkę. Dodatkowo wstawiano płytkę bez pożywki na 2 minuty do inkubatora. Następnie na płytkę hodowlaną z enukleowanymi fibroblastami i komórkami p0 143B nakraplano 2,5ml roboczego roztworu PEG, rozprowadzano PEG na płytce poprzez delikatne mieszanie przez 10s, następnie pozostawiano płytkę na 60s na płycie laminaru w celu umożliwienia komórkom fibroblastów i p0 143B przeprowadzenia fuzji, po czym odciągano PEG. Po odciągnięciu PEG przemywano płytkę trzykrotnie DMEM z dodatkiem 10% DMSO i raz czystym DMEM bez dodatków. Po odciągnięciu tej pożywki do hodowli dodawano 4ml pełnej pożywki DMEM o składzie podanym w tabeli 5. Po 24 godzinach usuwano pożywkę i zastępowano ją pożywką selekcyjną, pozbawioną urydyny i pirogronianu, a suplementowaną antybiotykami (1%), FBS (10%) oraz 5-bromo-2'-deoksyurydyną w końcowym stężeniu 0,1mg/ml. Pożywkę selekcyjną wymieniano co 2-3 dni. Selekcję cybryd przeprowadzano przez 14 dni, po czym zmieniano pożywkę na pełną z dodatkiem urydyny i pirogronianu, ale pozbawioną bromodeoksyurydyny. Komórki p0 są auksotrofami pod względem urydyny (U<sup>-</sup>) i pirogronianu, (P<sup>-</sup>), a także nie przeprowadzają fosforylacji oksydacyjnej, dlatego pożywka selekcyjna pozbawiona urydyny i pirogronianu pozwala wyeliminować z hodowli komórki p0 143B, które nie uległy fuzji z fibroblastami. Natomiast

suplementacja pożywki 5-bromo-2'-deoksyurydyną (5-BrdU) pozwala na rozróżnienie fibroblastów (TK<sup>+</sup>) od cybryd (TK<sup>-</sup>). Kinaza tymidynowa (TK) powoduje fosforylację 5-BrdU i jej interkalację do DNA, co przy wysokim stężeniu 5-BrdU powoduje zahamowanie wzrostu komórek. Aktywność TK jest zahamowana w komórkach p0, ale jest zachowana w fibroblastach, dlatego obecność 5-BrdU w pożywce selekcyjnej powoduje zahamowanie wzrostu fibroblastów i ich wyeliminowanie z hodowli, natomiast nie ma wpływu na wzrost cybryd. Schemat procesu konstrukcji cybryd przedstawiono na rysunku 11.



**Rysunek 11. Schemat procesu cybrydyzacji.** Opis procedury w tekście. (U<sup>-</sup>, P<sup>-</sup>) - auksotrofia pod względem urydyny (U) i pirogronianu (P); 5-BrdU - 5-bromo-2'-deoksyurydyna; TK - kinaza tymidynowa, TK<sup>-</sup> - brak aktywności kinazy tymidynowej, Komórki, które mają sprawne mitochondria (zawierające mtDNA bez mutacji - oznaczone białymi kropkami) tracą auksotrofię względem U i P (komórki U<sup>+</sup>, P<sup>+</sup>), natomiast komórki z dysfunkcyjnymi mitochondriami (zawierające mtDNA z mutacjami - oznaczone czarnymi kropkami) zachowują auksotrofię względem U i P (komórki U<sup>-</sup>, P<sup>-</sup>) (Schon i wsp., 2012; zmodyfikowano).

### **3.2.2 Izolacja całkowitego DNA**

- **Izolacja całkowitego DNA z krwi, biopsatu mięśnia szkieletowego i komórek hodowlanych**

Izolacji DNA z komórek krwi, biopsatu mięśnia szkieletowego oraz z komórek hodowlanych dokonywano metodą organiczną (fenol-chloroform) według następującej procedury: 10-50mg mięśnia zamrażano w ciekłym azocie i homogenizowano w moździerzu na proszek. Komórki hodowlane przemywano roztworem PBS, odklejano z wykorzystaniem trypsyny i wirowano, w celu otrzymania peletu komórkowego. Krew nie wymagała wcześniejszego przygotowania. Przygotowany materiał rozpuszczano w 500µl roztworu o następującym składzie: 10mM Tris-HCl pH 7,4; 10mM NaCl; 10mM EDTA i H<sub>2</sub>O. Następnie dodawano do roztworu 55µl 10% SDS i 25µl proteinazy K (20mg/ml, A&A Biotechnology) i inkubowano przez noc w 37<sup>0</sup>C. Następnego dnia DNA ekstrahowano kolejno fenolem (w proporcji 1:1), mieszaniną fenol/chloroform (w proporcji 1:1) (Amresco/Sigma-Aldrich) i chloroformem (w proporcji 1:1) - roztwory wirowano po 15min/12000rpm. DNA wytrącano przez dodanie 0,1 objętości 4M NaCl i 2,5 objętości 95% etanolu i pozostawiano na noc w -20<sup>0</sup>C. Po nocnej inkubacji roztwór wirowano 15min/12000rpm, przemywano zimnym 70% etanolem i ponownie wirowano 15min/12000rpm. Otrzymany osad suszono i zawieszano w wodzie.

- **Izolacja całkowitego DNA z włosów**

Włosy podzielono na krótkie fragmenty, przepłukiwano w wodzie i etanolu i umieszczano w 500µl roztworu o następującym składzie: 0,01M Tris-HCl; 0,01M EDTA; 0,1M NaCl (pH 8); 2% SDS; 0,039 M DTT; 50µg/ml proteinazy K, H<sub>2</sub>O. Roztwór inkubowano przez 2 godziny w 37<sup>0</sup>C. Po inkubacji DNA ekstrahowano równą objętością mieszaniny fenol/chloroform, a następnie n-butanolem - roztwory wirowano po 15min/12000rpm. DNA wytrącano po dodaniu 2,5 objętości etanolu (95%) i pozostawiono na noc w -20<sup>0</sup>C. Następnego dnia roztwór zwirowano 10min/12000rpm, przemyto 70% etanolem, ponownie zwirowano, próbkę osuszono i dodawano wodę.



- **Izolacja całkowitego DNA z nabłonka pęcherza moczowego**

Próbkę moczu wirowano 10min/14000rpm w celu otrzymania osadu komórek. Supernatant usunięto, a otrzymany osad zawieszano w 500μl roztworu o następującym składzie: 10mM TRIS; 1,2mM EDTA; 0,5% SDS; H<sub>2</sub>O. Następnie dodano 25μl (20mg/ml) proteinazy K i inkubowano w 65<sup>0</sup>C/2 godziny. Po inkubacji DNA ekstrahowano dwukrotnie równą objętością mieszaniny fenol/chloroform (w proporcji 1:1) i raz n-butanolem - roztwory wirowano po 15min/12000rpm. DNA wytrącano przez dodanie 0,1 objętości 4M NaCl i 2,5 objętości 95% etanolu i pozostawiano na noc w -20<sup>0</sup>C. Następnego dnia roztwór zwirowano 10min/12000rpm, przemyto 70% etanolem, ponownie zwirowano, próbkę osuszano i dodawano wody.

Stężenie wyizolowanego DNA z komórek krwi, biopsji mięśnia szkieletowego, komórek hodowlanych, włosów i nabłonka pęcherza moczowego sprawdzano przy użyciu spektrofotometru NanoDrop (NanoDrop Technologies).

### **3.2.3 Procedury detekcji mutacji LHON**

W celu detekcji mutacji LHON przeprowadzono reakcje sekwencjonowania wybranych fragmentów mtDNA, w których znajdują się znane mutacje. Poszukiwanie nieznanej mutacji u pacjentów z zanikiem nerwu wzrokowego o nieznanej etiologii polegało na sekwencjonowaniu wybranych genów, w których podejrzewano obecność mutacji, a w przypadku pacjenta z zanikiem nerwu wzrokowego z towarzyszącymi objawami neurologicznymi o nieznanej etiologii przeprowadzono sekwencjonowanie całego genomu mitochondrialnego.

- **Amplifikacja wybranych fragmentów mtDNA w celu detekcji mutacji LHON**
- **Pacjent z zanikiem nerwu wzrokowego o nieznanej etiologii**

W celu uzyskania prób do sekwencjonowania przeprowadzono amplifikację fragmentów mtDNA obejmujących geny kodujące następujące podjednostki I kompleksu łańcucha oddechowego: *ND1*, *ND4*, *ND5*, *ND6*. Amplifikację wybranych genów przeprowadzono z użyciem techniki PCR na DNA wyizolowanym z krwi probanda.

Charakterystykę starterów użytych do amplifikacji wybranych genów przedstawiono w tabeli w suplemencie 1. Do amplifikacji poszczególnych genów użyto następujących starterów:

- gen *ND1*: od FM13-5 do FM13-7
  - gen *ND4*: od FM13-17 do FM13-19
  - gen *ND5*: od FM13-20 do FM13-22
  - gen *ND6*: od FM13-22 do FM13-23
- **Pacjent z zanikiem nerwu wzrokowego z towarzyszącymi objawami neurologicznymi o nieznanej etiologii**

Amplifikację całego genomu mitochondrialnego z użyciem 28 par starterów, których sekwencje i obszar w mtDNA, w którym przyłączają się startery przedstawiono w suplemencie 1, przeprowadzono na DNA wyizolowanym z krwi probanda.

- **Pacjenci z rodziny LHON z dwiema mutacjami m.11778G>A i m.3460G>A**

W celu uzyskania prób do sekwencjonowania przeprowadzono amplifikację fragmentów mtDNA obejmujących geny podjednostek I kompleksu łańcucha oddechowego, w których występują poszukiwane mutacje: m.11778G>A (gen *ND4*) i m.3460G>A (gen *ND1*). Reakcję PCR przeprowadzano na DNA wyizolowanym z cybryd. W tabeli 6 przedstawiono startery wykorzystane do reakcji PCR.

**Tabela 6. Opis starterów użytych do amplifikacji fragmentów genów *ND1* i *ND4* kodujących podjednostki kompleksu I łańcucha oddechowego.** Startery na końcach 5' zawierają dodatkowo 18 nukleotydową sekwencję faga M13; sekwencja FM13 dla startera F 5'TGTAACGACGCGCCAGT3'; sekwencja FM13 dla startera R 5'CAGGAAACAGCTATGACC3'.

oznaczenie startera	gen	sekwencja startera 5'-3'	pozycja przyłączania startera w mtDNA
<b>FM13.5F</b> <b>FM13.5R</b>	<i>ND1</i>	<b>GGATCATGGACATCCCGATG</b> <b>AAGGCTAGGCTAGAGGTG</b>	<b>2995-3013</b> <b>3645-3627</b>
<b>FM13.19F</b> <b>FM13.19R</b>	<i>ND4</i>	<b>AGCCACATAGCCCTCGTAG</b> <b>TGGTTATAGTAGTGTGCATGG</b>	<b>11633-11651</b> <b>12361-12341</b>

Na DNA wyizolowanym z krwi jednego probanda z rodziny z dwiema mutacjami LHON przeprowadzono amplifikację i sekwencjonowanie całego mtDNA z wykorzystaniem starterów przedstawionych w tabeli w suplemencie 1.



- **Skład mieszaniny i warunki reakcji PCR**

Do przeprowadzenia reakcji PCR ze wszystkimi wyżej wymienionymi parami starterów zastosowano mieszaninę reakcyjną o składzie przedstawionym w tabeli 7.

**Tabela 7. Skład mieszaniny reakcji PCR.**

skład mieszaniny reakcyjnej	stężenie w mieszaninie reakcyjnej
DNA	100ng
starter F	0,2μM
starter R	0,2μM
dNTP (A&A Biotechnology)	400μM
polimeraza Walk (A&A Biotechnology)	1U
bufor do polimerazy Walk (A&A Biotechnology)	1X
H <sub>2</sub> O	do 50μl

Reakcję PCR przeprowadzono w objętości 50μl w następujących warunkach:

94<sup>0</sup> / 3 min  
 94<sup>0</sup>C / 30 s  
 58<sup>0</sup>C / 30 s  
 72<sup>0</sup>C / 1 min  
 72<sup>0</sup>C / 7 min  
 4<sup>0</sup>C ∞

} 35 cykli

Obecność produktu PCR sprawdzono na 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny w świetle UV w obecności standardu wielkości (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, zakres od 100-10000pz). Po potwierdzeniu obecności produktów amplifikacji próby przygotowywano do reakcji sekwencjonowania.

### **3.2.4 Sekwencjonowanie**

Produkty reakcji PCR oczyszczono na kolumnkach krzemionkowych wchodzących w skład zestawu GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific), zgodnie z zaleceniami producenta. Po oczyszczaniu mierzono stężenie DNA w próbach przy użyciu spektrofotometru NanoDrop (NanoDrop Technologies) i przygotowano rozcieńczenia (do końcowego stężenia 10 ng/ml). Sekwencjonowanie było przeprowadzane w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN. Uzyskane wyniki sekwencjonowania analizowano z wykorzystaniem oprogramowania Sequencher 4.1.4.

### **3.2.5 Detekcja mutacji u członków rodzin probandów**

Po zidentyfikowaniu mutacji m.3635G>A w genie *ND1* w DNA z krwi probanda z zanikiem nerwu wzrokowego o nieznannej etiologii przeprowadzono również amplifikację i sekwencjonowanie fragmentu mtDNA obejmującego ten gen na DNA wyizolowanym z krwi matki probanda i jego chorego kuzyna. Natomiast po zidentyfikowaniu mutacji m.13042G>A w genie *ND5* we krwi probanda z zanikiem nerwu wzrokowego z towarzyszącymi objawami neurologicznymi o nieznannej etiologii przeprowadzono także amplifikację i sekwencjonowanie fragmentu mtDNA obejmującego ten gen na DNA wyizolowanym z włosów, mięśnia szkieletowego i nabłonka dróg moczowych probanda oraz włosów, krwi i nabłonka dróg moczowych matki probanda.

### **3.2.6 Ocena poziomu heteroplazmii zidentyfikowanych mutacji**

W celu określenia poziomu heteroplazmii wykrytych mutacji zastosowano metodę znakowania izotopem [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP (Hartmann Analytic) produktu PCR w ostatnim cyklu połączoną z określeniem polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (technika ang. *last-cycle hot PCR/RFLP*).

W pierwszej kolejności przeprowadzano amplifikację fragmentów mtDNA obejmującego wykryte mutacje, następnie produkt reakcji PCR wyznakowano izotopem i trawiono endonukleazami restrykcyjnymi, rozdzielano na żelu poliakryloamidowym i przeprowadzano detekcję rozdzielonych fragmentów DNA.

- **Amplifikacja fragmentów DNA obejmujących wykryte mutacje**

1) Amplifikację fragmentu mtDNA (3608-4239) otaczającego mutację m.3635G>A przeprowadzono na DNA wyizolowanym z krwi probanda, jego zdrowej matki, chorego kuzyna i niespokrewnionej z nimi osoby. Do reakcji wykorzystano następujące starery: starter R przyłączał się w regionie 4239-4219 mtDNA, starter F (przyłączający się w regionie 3608-3633 mtDNA) wprowadzając zmianę nukleotydową C>T w pozycji 3632, co pozwoliło na stworzenie nowego miejsca restrykcyjnego dla endonukleazy restrykcyjnej *TruI* w sekwencji zawierającej mutację. Opis starterów przedstawiono w tabeli 8.

**Tabela 8. Opis starterów używanych do amplifikacji regionu otaczającego mutację m.3635G>A.** Zmianę nukleotydową w sekwencji startera wprowadzającą nowe miejsce restrykcyjne dla endonukleazy *TruI* zaznaczono na czerwono. Starter oznaczony FM13 na końcach 5' zawiera dodatkowo 18 nukleotydową sekwencję faga M13: 5'CAGGAAACAGCTATGACC3'.

oznaczenie startera	sekwencja startera 5'-3'	dlugość produktu PCR (pz)	pozycja przyłączania startera w mtDNA
<b>3635-F</b>	<b>GCCTCCTATTTATTCTAGCCACCTTT</b>	<b>632</b>	<b>3608-3633</b>
<b>FM13-6R</b>	<b>GATTGTAATGGGTATGGAGAC</b>		<b>4239-4219</b>

2) W celu amplifikacji fragmentu mtDNA (12951-13227), w którym znajduje się mutacja m.13042G>A zastosowano reakcję PCR z wykorzystaniem starterów opisanych w tabeli 9. Amplifikację przeprowadzono na DNA wyizolowanym z krwi i mięśnia szkieletowego probanda oraz z krwi matki probanda oraz niespokrewnionej z nimi osoby. Starter R nie był modyfikowany.

**Tabela 9. Opis starterów używanych do amplifikacji regionu otaczającego mutację m.13042G>A.** Starter oznaczony FM13 na końcu 5' zawiera dodatkowo 18 nukleotydową sekwencję faga M13: 5'TGTAAACGACGGCCAGT3'.

oznaczenie startera	sekwencja startera 5'-3'	długość produktu PCR (pz)	pozycja przyłączenia startera w mtDNA
<b>FM13-21F</b>	<b>CGCTAATCCAAGCCTCACC</b>	<b>277</b>	<b>12951-12969</b>
<b>13042-R</b>	<b>GTCATTTTGTGTAAGGGCGC</b>		<b>13227-13208</b>

3) W celu amplifikacji fragmentów mtDNA, w których lokują się mutacje m.11778G>A i m.3460G>A zastosowano reakcję PCR z wykorzystaniem starterów opisanych w tabeli 10. Amplifikację przeprowadzono na DNA wyizolowanym z komórek krwi, limfoblastów, fibroblastów i cybryd od 6 pacjentów z rodziny z dwiema mutacjami LHON.

**Tabela 10. Opis starterów używanych do amplifikacji fragmentów otaczających mutacje m.11778G>A i m.3460G>A.**

oznaczenie startera	mutacja LHON	sekwencja startera 5'-3'	długość produktu PCR (pz)	pozycja przyłączenia startera w mtDNA
<b>LH-1F LH-1R</b>	<b>m.3460G&gt;A</b>	<b>CAGCCACATAGCCCTCGTAG GCGAGGTTAGCGAGGCTTGC</b>	<b>302</b>	<b>3275-3295 3577-3557</b>
<b>LH-4F LH-4R</b>	<b>m.11778G&gt;A</b>	<b>CAGTCAGAGGTTCAATTCCTC TGGGGAGGGGGGTTTCATAGTA</b>	<b>230</b>	<b>11632-11651 11862-11843</b>

Do przeprowadzenia reakcji PCR ze wszystkimi wyżej wymienionymi parami starterów zastosowano mieszaninę reakcyjną o składzie przedstawionym w tabeli 11.

**Tabela 11. Skład mieszaniny reakcji PCR.**

skład mieszaniny reakcyjnej	stężenie w mieszaninie reakcyjnej
DNA	100ng
starter F	0,2μM
starter R	0,2μM
dNTP (A&A Biotechnology)	400μM
polimeraza Run (A&A Biotechnology)	1U
bufor do polimerazy Run (A&A Biotechnology)	1X
H <sub>2</sub> O	do 25μl

Reakcję PCR przeprowadzono w objętości 25μl. Dla amplifikacji każdej z mutacji zmienione były temperatury przyłączania starterów, czas wydłużania starterów oraz liczba cykli reakcji PCR, natomiast pozostałe warunki reakcji były identyczne dla amplifikacji każdej z mutacji.

\* oznacza warunki specyficzne dla mutacji m.3635G>A

\*\* oznacza warunki specyficzne dla mutacji m.13042G>A

\*\*\* oznacza warunki specyficzne dla mutacji m.11778G>A i m.3460G>A

Warunki reakcji PCR dla m.3635G>A, m.1342G>A, m.11778G>A oraz m.3460G>A:

94<sup>0</sup>C / 5 min

94<sup>0</sup>C / 30 s

56<sup>0</sup>C\*/55<sup>0</sup>C\*\*/58<sup>0</sup>C\*\*\* / 30 s } 30\*/35\*\*/30\*\*\* cykli

72<sup>0</sup>C / 45 s\*/ 1 min\*\*/45 s\*\*\* }

72<sup>0</sup>C / 7 min

4<sup>0</sup>C ∞

Obecność produktu PCR o długości 632pz (dla m.3635G>A), 277pz (dla m.13042G>A), 230pz (dla m.11778G>A) i 302pz (dla m.3460G>A) sprawdzono na 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydy w świetle UV w obecności standardu wielkości (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific).

- **Znakowanie produktu PCR izotopem**

Po określeniu obecności produktów PCR przeprowadzano dodatkowy cykl PCR z dodatkiem izotopu [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dATP (Hartmann Analytic). Dodatkowy cykl PCR (ang. *last-cycle hot PCR*) zastosowano w celu wyznakowania DNA poprzez inkorporację izotopu do DNA zgodnie z procedurą opisaną przez Moraes i wsp. (1992).

- **Analiza RFLP wyznakowanych izotopowo produktów PCR**

Wyznakowane izotopem produkty amplifikacji fragmentów DNA, w których znajdują się mutacje LHON, trawiono endonukleazami restrykcyjnymi i rozdzielano na 12% żelu poliakryloamidowym. Po zakończonej elektroforezie żel suszono i poddano ekspozycji przez noc na ekranie fosforowym (Hypercassette<sup>TM</sup>, Amersham Biosciences). Obraz odczytano za pomocą urządzenia Fujifilm Phosphoimager, FLA-7000. Poziom heteroplazmii mutacji określono w programie Multi Gauge V3.0.

**1) Analiza RFLP mutacji m.3635G>A**

W celu analizy poziomej mutacji m.3635G>A z wykorzystaniem techniki RFLP, wyznakowane izotopowo produkty PCR poddano trawieniu endonukleazą restrykcyjną *Tru*II (Thermo Scientific) w temperaturze 65°C/noc. Sekwencja bez mutacji ulega cięciu endonukleazą *Tru*II na dwa fragmenty o długości 454pz i 178pz. Mutacja m.3688G>A wprowadza dodatkowe miejsce restrykcyjne i w wyniku cięcia powstają fragmenty o długościach 454pz, 153pz i 25pz.

**2) Analiza RFLP mutacji m.13042G>A**

W celu analizy poziomej mutacji m.13042G>A z wykorzystaniem techniki RFLP, wyznakowane izotopowo produkty PCR poddano trawieniu endonukleazą restrykcyjną *Bbv*CI (New England Biolabs) w temperaturze 37°C/noc. Mutacja m.13042G>A eliminuje miejsce restrykcyjne dla enzymu *Bbv*CI. Sekwencja bez mutacji ulega cięciu endonukleazą na dwa fragmenty o długości 189pz i 88pz. W przypadku wystąpienia mutacji długość nietrawionego fragmentu wynosi 277pz.

### **3) Analiza RFLP mutacji m.11778G>A i m.3460G>A**

W celu analizy poziomu mutacji m.11778G>A i m.3460G>A z wykorzystaniem techniki RFLP, wyznakowane izotopowo produkty PCR poddano trawieniu endonukleazami restrykcyjnymi:

- dla m.11778G>A wykorzystano endonukleazę restrykcyjną *MaeIII* (Roche) trawiając produkt PCR w temperaturze 55°C/noc. m.11778G>A powoduje powstanie miejsca restrykcyjnego dla enzymu *MaeIII*. Długość fragmentów po trawieniu endonukleazą w obecności mutacji wynosi 146pz oraz 84pz. Długość niestawionego fragmentu w przypadku braku mutacji wynosi 230pz.
- dla m.3460G>A wykorzystano endonukleazę restrykcyjną *BsaHI* (New England Biolabs) trawiając produkt PCR w temperaturze 37°C/noc. m.3460G>A powoduje zanik miejsca restrykcyjnego dla enzymu *BsaHI*. Długość fragmentów po trawieniu endonukleazą w przypadku braku mutacji wynosi 183pz i 119pz. W przypadku wystąpienia mutacji długość nietrawionego fragmentu wynosi 302pz.

#### **3.2.7 Analizy genetyczne transmitochondrialnych hybryd cytoplazmatycznych (cybryd)**

Na DNA wyizolowanym z komórek cybryd z mutacjami LHON i kontrolnych przeprowadzono analizy oceniające skuteczność procesu cybrydyzacji. Zbadano obecność mtDNA w komórkach cybryd, a także przeprowadzono analizę zgodności sekwencji mtDNA w cybrydach z mtDNA z fibroblastów, a także analizę zgodności sekwencji jądrowego DNA w cybrydach i komórkach ρ0 143B.

- **Analiza obecności mtDNA w komórkach transmitochondrialnych hybryd cytoplazmatycznych (cybryd)**

W celu określenia obecności mtDNA w komórkach cybryd, na całkowitym DNA wyizolowanym z komórek cybryd pacjentów z LHON i osób z grupy kontrolnej przeprowadzono reakcję długiego PCR (ang. *long PCR*).

Reakcja *long PCR* pozwala na zamplifikowanie fragmentu mtDNA wielkości 9815pz. Do przeprowadzenia reakcji użyto zestawu Expand Long Template PCR System (Roche),

zgodnie z zaleceniami producenta. Startery użyte do reakcji *long PCR* przedstawiono w tabeli 12.

**Tabela 12. Opis starterów używanych do reakcji *long PCR*.** Startery na końcach 5' zawierają dodatkowo 18 nukleotydową sekwencję faga M13; sekwencja FM13 dla startera F 5'TGTAAAACGACGGCCAGT3'; sekwencja FM13 dla startera R 5'CAGGAAACAGCTATGACC3'.

oznaczenie startera	sekwencja startera 5'-3'	długość produktu PCR (pz)	pozycja przyłączenia startera w mtDNA
<b>FM13-11F</b>	<b>CTATGATATCAATTGGCTTCC</b>	<b>9815</b>	<b>6730-6750</b>
<b>FM13-D1R</b>	<b>AACGTGTGGGCTATTTAGGC</b>		<b>16545-16526</b>

Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 13.

**Tabela 13. Skład mieszaniny reakcji *long PCR*.**

skład mieszaniny reakcyjnej	stężenie w mieszaninie reakcyjnej
<b>DNA</b>	<b>200ng</b>
<b>starter F</b>	<b>0,3μM</b>
<b>starter R</b>	<b>0,3μM</b>
<b>dNTP (A&amp;A Biotechnology)</b>	<b>20mM</b>
<b>polimeraza (Roche)</b>	<b>1, 875U</b>
<b>Bufor nr 2 do polimerazy (Roche)</b>	<b>1X</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>do 25μl</b>



Reakcję PCR przeprowadzono w objętości 25µl w następujących warunkach:

92°C / 2 min  
92°C / 10 s }  
55°C / 30 s } 9 cykli  
68°C / 8 min }  
92°C / 15 s }  
55°C / 30 s } 24 cykle  
68°C / 8 min }  
(+ 20s w każdym cyklu)  
68°C / 20 min  
10°C ∞

Obecność produktu PCR o długości 9815pz sprawdzono na 0,8% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydy w świetle UV w obecności standardu wielkości (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific).

- **Analiza zgodności sekwencji mtDNA w cybrydach z mtDNA z fibroblastów**

W celu oceny zgodności sekwencji mtDNA między cybrydami a fibroblastami przeprowadzono reakcje sekwencjonowania.

W pierwszej kolejności zamplifikowano obszar pętli D mtDNA wykorzystując całkowite DNA wyizolowane z komórek fibroblastów i cybryd pacjentów z LHON i osób z grupy kontrolnej w celu zbadania zgodności sekwencji pętli D mtDNA cybryd i fibroblastów z mutacjami LHON i osób z grupy kontrolnej. Do reakcji PCR wykorzystano startery FM13-D1F, FM13-D1R, FM13.5F oraz FM13.5R, których charakterystykę przedstawiono w tabeli w suplemencie 1. Na całkowitym DNA z fibroblastów i cybryd pacjentów przeprowadzono również amplifikację fragmentów obszaru kodującego mtDNA, w którym mieszczą się mutacje m.11778G>A i m.3460G>A w celu określenia ich obecności z wykorzystaniem starterów opisanych wcześniej w tabeli 6. Skład mieszaniny reakcji PCR i jej warunki dla każdej z pary starterów były identyczne z tymi przedstawionymi w rozdziale 3.2.3.

- **Analiza zgodności sekwencji jądrowego DNA w cybrydach z jądrowym DNA w komórkach p0 143B**

W celu określenia zgodności sekwencji jądrowego DNA zawartego w cybrydach z tym z komórek p0 143B przeprowadzono analizę skróconych profili genetycznych dla poszczególnych linii komórkowych z wykorzystaniem polimorficznych markerów mikrosatelitarnych, w których polimorfizm polega na zmiennej ilości powtórzeń określonych krótkich, kilkunukleotydowych sekwencji DNA (STR). Markery STR są standardowo wykorzystywane w genetyce sądowej do tworzenia profili genetycznych. Standardowo wykorzystuje się 13 *loci* STR wchodzące w skład systemu CODIS. W ramach niniejszej pracy wykorzystano trzy markery STR tego systemu: THO1, CSF1PO i D21S11. Charakterystykę markerów STR użytych do stworzenia skróconych profili genetycznych linii komórkowych cybryd pacjentów z LHON i osób z grupy kontrolnej oraz komórek p0 143B przedstawiono w tabeli 14. Numer allelu w danym *locus* mikrosatelitarnym odpowiada liczbie powtórzeń sekwencji tandemowej.

**Tabela 14. Charakterystyka markerów STR użytych do stworzenia skróconych profili genetycznych badanych linii komórkowych cybryd i komórek p0 143B** (źródło: baza danych Short Tandem Repeat DNA Internet DataBase). n-w zapisie zastąpione jest cyfrą wskazującą ile razy dana sekwencja była powtórzona, co odpowiada numerze allelu np. allel 3 oznacza, że dana sekwencja była powtórzona trzykrotnie.

nazwa markera	lokalizacja chromosomowa	sekwencja powtarzalna	zakres alleli
THO1	11p15.5	[AATG] <sub>n</sub>	3-14
D21S11	21q11.2-q21	[TCTA] <sub>n</sub> / [TCTG] <sub>n</sub>	12-41.2
CSF1PO	5q33.3-34	[AGAT] <sub>n</sub>	6-16

Pierwszy etap tworzenia skróconych profili genetycznych polegał na amplifikacji badanych markerów (*loci* mikrosatelitarnych) na DNA wyizolowanym z poszczególnych linii komórkowych. Zastosowano reakcję PCR umożliwiającą amplifikację wszystkich trzech *loci* mikrosatelitarnych w jednej próbówce – reakcję multiplex PCR. W reakcji multiplex PCR wykorzystano startery dla poszczególnych markerów wyznakowane na 5' końcu barwnikami fluorescencyjnymi. Opis starterów stosowanych w reakcji multiplex PCR przedstawiono w tabeli 15.

**Tabela 15. Opis starterów stosowanych w reakcji multiplex PCR.** 6-FAM (barwnik niebieski); HEX (barwnik zielony)

nazwa markera	oznaczenie startera	barwnik znakujący	sekwencja startera 5'-3'
THO1	THO1-F	6-FAM	6-FAM-CCTGTTCTCCTTATTTCCC
	THO1-R		GGGAACACAGACTCCATGGTG
D21S11	D21S11-F	HEX	HEX-ATTCCCCAAGTGAATTGC
	D21S11-R		GGTAGATAGACTGGATAGATAGACGA
CSF1PO	CSF1PO-F	HEX	HEX-ACAGTAACTGCCTTCATAGATAG
	CSF1PO-R		GTGTCAGACCCTGTTCTAAGTA

Skład mieszaniny reakcji multiplex PCR przedstawiono w tabeli 16. W reakcji użyto mieszaniny starterów F i R dla każdego z markerów STR.

**Tabela 16. Skład mieszaniny reakcji multiplex PCR.**

skład mieszaniny reakcyjnej	stężenie w mieszaninie reakcyjnej
DNA	100ng
mieszanina starterów	0,2μM
dNTP (A&A Biotechnology)	400μM
polimeraza Run (A&A Biotechnology)	1U
bufor do polimerazy Run (A&A Biotechnology)	1X
H <sub>2</sub> O	do 25μl

Reakcję multiplex PCR przeprowadzono w objętości 25μl w następujących warunkach:

95°C / 12 min

95°C / 30s  
 60°C / 90s  
 72°C / 45s

} 35 cykli

72°C / 30min

7°C ∞

Obecność produktów PCR sprawdzono na 3% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydy w świetle UV w obecności standardu wielkości (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific). Za pomocą elektroforezy kapilarnej fluorescencyjnie wyznakowanych produktów PCR wobec standardu wielkości GeneScan™-600 LIZ® wykonanej w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN wyznaczono wielkość otrzymanych produktów. Wyznaczenie długości otrzymanych produktów PCR wykonano w programie Peak Scanner 1.0. Otrzymane wartości porównano z zakresem długości produktów PCR dla poszczególnych alleli według bazy danych Short Tandem Repeat DNA Internet DataBase. Analiza ta pozwoliła na określenie alleli występujących w każdym z badanych loci i stworzenie dla każdego *locus* profilu genetycznego. Stworzone profile genetyczne dla poszczególnych loci każdej z badanych linii komórkowych cybryd porównywano z profilami tych loci dla komórek p0 143B w celu oceny ich zgodności.

### **3.2.8 Analiza haplogrup mitochondrialnych pacjentów z LHON**

Analiza haplogrup mitochondrialnych była przeprowadzona na podstawie obecności charakterystycznych polimorfizmów definiujących haplogrupy znajdujące się w obszarze pętli D i obszarach kodujących mtDNA. W celu identyfikacji tych polimorfizmów przeprowadzono reakcję sekwencjonowania mtDNA. Sekwencjonowanie wybranych regionów mtDNA przeprowadzono na całkowitym DNA wyizolowanym z krwi probandów z LHON. Sekwencjonowanie przeprowadzano zgodnie z protokołem opisanym w rozdziale 3.2.4.

W pierwszej kolejności sekwencjonowano obszar pętli D mtDNA, w którym w przeważającej większości znajdują się polimorfizmy definiujące haplogrupy mitochondrialne występujące w Europie (poza haplogrupą H i U). W następnej kolejności sekwencjonowano konkretne regiony obszaru kodującego mtDNA, w którym znajdują się pozostałe polimorfizmy definiujące haplogrupy, które wskazywało sekwencjonowanie pętli D. Zastosowane startery do określenia haplogrup mitochondrialnych wraz z określeniem polimorfizmów obszaru pętli D i obszaru kodującego mtDNA dla poszczególnych haplogrup mitochondrialnych przedstawiono w tabeli 17. Kolejność haplogrup w tabeli jest uszeregowana od najczęstszej do najrzadszej haplogrupy w Europie. Charakterystykę wykorzystanych starterów przedstawiono w tabeli w suplemencie 1.

**Tabela 17. Startery i polimorfizmy pętli D i obszaru kodującego mtDNA definiujące haplogrupy mtDNA.** Startery na końcach 5' zawierają dodatkowo 18 nukleotydową sekwencję faga M13 (FM13); sekwencja FM13 dla startera F 5'TGTAAAACGACGGCCAGT3'; sekwencja FM13 dla startera R 5'CAGGAAACAGCTATGACC3'.

haplogrupa mtDNA	oznaczenie starterów	polimorfizmy pętli D mtDNA	polimorfizmy obszaru kodującego mtDNA
H	FM13-11F i R	-	7028C
U	FM13-19F i R	-	12308A>G
T	FM13-8F i R FM13-D1F i R	16126T>C 16294C>T	4917A>G
J	FM13-22F i R FM13-D1F i R	16069C>T 16126T>C	13708G>A
K	FM13-14F i R FM13-19F i R FM13-D1F i R	16224T>C 16311T>C	12308A>G 9055G>A
V	FM13-7F i R FM13-D1F i R	16298T>C	4580G>A
X	FM13-10F i R FM13-D1F i R	16183C 16189T>C 16223C>T 16278C>T	6371C>T
I	FM13-7F i R FM13-16F i R FM13-D1F i R	16129G>A 16223C>T 16391G>A	4529A>T 10034T>C
W	FM13-19F i R FM13-D1F i R	16223C>T 16292C>T	11947A>G

### 3.2.9 Analizy hodowli komórkowych

#### 3.2.9.1 Hodowla komórek

Do przemywania komórek przed ich pasażowaniem używano roztworu PBS (Sigma-Aldrich). Trypsynizacji komórek dokonywano z użyciem roztworu Trypsyna-EDTA pH=8 (Sigma-Aldrich). Do liczenia komórek wybarwiano je błękitem trypanu (Sigma-Aldrich), a liczenia dokonywano pod mikroskopem świetlnym Olympus CK40 przy użyciu komory hemocytometrycznej (komora Thoma). Do bankowania komórek stosowano roztwór

składający się z całkowitej pożywki hodowlanej (70% składu roztworu) suplementowanej dodatkową objętością FBS (20% składu roztworu) i DMSO (dimetylosulfotlenek, 10% składu roztworu) (Sigma-Aldrich). Komórki w roztworze do bankowania przenoszono do probówek do głębokiego mrożenia (Sarstedt) i przenoszono do pojemnika z izopropanolem (MrFrosty, Nalgene), który umieszczano w zamrażarce o temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.9.2 Analiza apoptozy**

Analizę apoptozy w wyprowadzonych liniach komórkowych przeprowadzono czterema metodami:

- analiza liczby wolnych nukleosomów
- analiza aktywność kaspaz 3 i 7
- analiza proteolizy polimerazy PAR-1 (PARP-1)
- analiza mikroskopowa jąder komórkowych.

Komórki fibroblastów i cybryd płukano PBS, trypsynizowano, aktywność trypsyny hamowano dodając pełnej pożywki hodowlanej z 10% FBS, następnie komórki wirowano (5min/1200g), płukano PBS i ponownie wirowano. Komórki limfoblastów przygotowywano analogicznie, z pominięciem etapu trypsynizacji, gdyż są to komórki rosnące w zawiesinie. Komórki barwiono błękitem trypanu (komórki martwe barwią się na niebiesko), inkubowano przez 1 minutę w temperaturze pokojowej i liczono przy użyciu komory hemocytometrycznej (komora Thoma) i wysiewano na płytki 6-dółkowe (Greiner bio-one) w ilości  $1 \times 10^4$  komórek na dółek, a następnie hodowano przez 24 godziny, w  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , w trzech różnych warunkach hodowlanych:

- w pożywce pełnej
- w pożywce pozbawionej glukozy uzupełnianej D-galaktozą (Sigma-Aldrich), w końcowym stężeniu 5mM
- w pożywce pełnej uzupełnianej rotenonem (Sigma-Aldrich), w końcowym stężeniu  $2,5\mu\text{M}$

Po 24 godzinach komórki odklejano od naczyń hodowlanych (poza limfoblastami) i analizowano w nich apoptozę.

- **Analiza liczby wolnych nukleosomów**

Ocenę liczby komórek apoptotycznych prowadzono przy użyciu testu immunoenzymatycznego Cell Death Detection ELISA<sup>Plus</sup> (Roche), zgodnie z zaleceniami producenta. Do każdego pomiaru wykorzystywano  $1 \times 10^4$  komórek dla wszystkich warunków hodowlanych. Każdą hodowlę analizowano w trzech powtórzeniach. Pomiar absorbancji mierzono przy 405nm przy pomocy czytnika płytek Paradigm Detection Platform (Beckman Coulter). Poziom absorbancji był proporcjonalny do liczby wolnych nukleosomów.

- **Analiza aktywności kaspaz 3 i 7**

Analizę aktywności kaspaz 3 i 7 mierzono przy użyciu zestawu Caspase-Glo<sup>TM</sup> 3/7 Assay (Promega) zgodnie z zaleceniami producenta. Do każdego pomiaru wykorzystano  $1 \times 10^4$  komórek dla wszystkich warunków hodowlanych. Każdą hodowlę analizowano w trzech powtórzeniach. Stosowany odczynnik zawiera tetrapeptyd z motywem DEVD, który jest substratem dla kaspaz 3 i 7. Dodanie odczynnika powoduje lizę komórek i cięcie substratu przez kaspazy 3 i 7. Na skutek cięcia generowany jest sygnał luminescencyjny przez uwalnianą lucyferazę. Luminescencja jest wprost proporcjonalna do aktywności kaspaz. Pomiar luminescencji wykonywano przy pomocy czytnika płytek DTX 880 (Beckman Coulter).

- **Analiza proteolizy PARP-1**

Analizę proteolizy białka PARP-1 wykonano z wykorzystaniem metody western blot z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko formie natywnej białka (116kDa) i ciętej (89kDa), jak również przeciwciał skierowanych przeciwko  $\beta$ -aktynie, stanowiącej kontrolę ilości nałożonego białka. Analizę białka PARP-1 przeprowadzano na lizatach białkowych komórek hodowanych przez 24 godziny w następujących warunkach hodowlanych:

- w pożywce pełnej
- w pożywce pozbawionej glukozy uzupełnianej D-galaktozą (Sigma-Aldrich), w końcowym stężeniu 5mM
- w pożywce pełnej uzupełnianej rotenonem (Sigma-Aldrich), w końcowym stężeniu 2,5 $\mu$ M

○ **Przygotowanie preparatów białkowych**

Komórki przeznaczone do analizy zebrano z butelek hodowlanych, zwirowano (5min/1200g), następnie przepłukano zimnym roztworem PBS i zwirowano ponownie. Osad komórek zawieszono w 20µl buforu RIPA (Sigma-Aldrich), zawierającego w zalecanej przez producenta ilości koktajl inhibitorów proteaz (cOmplete ULTRA Tablets, Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche). Komórki z buforem RIPA inkubowano w lodzie przez około godzinę, worteksując co 10min, przez około 10 sekund. Następnie roztwory przenoszono do 1,5ml probówek Eppendorf i wirowano 10min/13000rpm w temperaturze 4°C w wirówce Eppendorf Centrifuge 5415R. Po zwirowaniu supernatant zawierający białka przenoszono do nowych probówek i trzymano w lodzie do czasu dalszych analiz.

○ **Ocena stężenia białka**

Stężenie wyizolowanych białek w supernatancie znad osadu komórkowego mierzono metodą kolorymetryczną Bradford z wykorzystaniem gotowego odczynnika Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) rozcieńczonego wodą zgodnie z zaleceniami producenta. W celu oznaczenia stężenia białka mieszano 1ml roztworu Protein Assay Dye Reagent 1X z 1µl supernatantu białkowego. Równocześnie przygotowano także próbki o znanym stężeniu białka - standardy, w celu stworzenia krzywej wzorcowej. Wykorzystano rozcieńczone roztwory albumny wołowej (BSA) o stężeniach 0,5mg/ml, 1mg/ml, 1,5mg/ml i 2mg/ml. 1µl każdego ze standardów mieszano z 1ml roztworu Protein Assay Dye Reagent 1X. Po zmieszaniu odczynnika Bradford z próbkami inkubowano roztwory przez 10min w RT po czym mierzono stężenie białka w plastikowych kuwetach. Pomiaru stężenia białka dokonywano w spektrofotometrze DU730 LifeScience uv/VIS Spectrophotometer – Beckman Coulter przy długości fali 595nm.

○ **Analiza western blot**

Analizę western blot przeprowadzano bezpośrednio po uzyskaniu lizatu komórkowego. Do rozdzielania białek zastosowano denaturującą elektroforezę w żelu poliakryloamidowym - metodę SDS-PAGE. Białko PARP-1 rozdzielano w 12% żelu poliakryloamidowym (12% żel rozdzielający i 4% żel zagęszczający). Przed nałożeniem próbek białkowych na żel denaturowano je poprzez zmieszanie z buforem Laemmliego 1x



i podgrzanie w 95°C przez 5 minut (Laemmli 5×: 0,2M Tris pH 6,8; 10% (w/v) SDS; 10mM β-merkaptotanol; 20% (v/v) glicerol; 0,05% (w/v) błękit bromofenolowy). Na żel nakładano 30μg białka, jako marker wielkości wykorzystano marker białkowy PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo-Scientific). Elektroforezę prowadzono w aparacie MiniPROTEAN Tetra Handcast System (Bio-Rad) przy napięciu 100V w buforze glicynowym o pH 8,3 (25mM Tris; 200mM glicyna; 0,1% (w/v) SDS) przez 1 – 1,5 godziny.

Transfer białek z żelu poliakryloamidowego na membranę nitrocelulozową Protran Nitrocellulose BA85 Membrane o porach wielkości 0,45μm (Whatman™) wykonano prowadząc mokry elektrotransfer z użyciem buforu glicynowego o pH 8,3 (25mM Tris; 200mM glicyna; 10% metanol) w aparacie MiniPROTEAN Tetra Handcast System (Bio-Rad) z użyciem zestawu do transferu Mini-Trans Blot Cell (Bio-Rad). Transfer prowadzono przy natężeniu 30V przez 16 godzin w chłodni. Po tym czasie oceniano efektywność transferu poprzez detekcję białek na membranie wybarwiając ją Ponceau S. Barwnik ten wiąże się nietrwale do polipeptydów i pozwala na wizualizację białek w postaci różowej drabinki.

Po ocenie jakości transferu barwnik odpłukano ddH<sub>2</sub>O, a membranę blokowano 30min w 5% odtłuszczonym mleku (mleko rozpuszczone w roztworze TBS) na kołysce laboratoryjnej. Następnie odpłukiwano mleko poprzez trzykrotne 10-minutowe płukanie membrany buforem TBS (50mM Tris; 150mM NaCl). Po odpłukaniu mleka membranę inkubowano z przeciwciałem I-rzędowym anti-PARP-1 (źródło: przeciwciało królicze, Cell Signaling) rozcieńczonym 1:1000 w 5% mleku oraz przeciwciałem I-rzędowym anti-β-aktyna (źródło: przeciwciało mysie, Sigma-Aldrich) rozcieńczonym 1:5000. Inkubację przeprowadzono przez noc w chłodni na kołysce laboratoryjnej.

Po nocnej inkubacji usunięto roztwór z przeciwciałami I-rzędowymi i trzykrotnie płukano membranę buforem TBS na kołysce laboratoryjnej w temperaturze pokojowej, a następnie dodawano roztwór przeciwciał II-rzędowych rozpuszczonych w 5% odtłuszczonym mleku. Wykorzystano przeciwciało anti-królicze w celu wykrycia białka PARP-1 (źródło: koza, Sigma-Aldrich) rozpuszczone w odtłuszczonym mleku w proporcji 1:10000 i anti-mysie w celu wykrycia β-aktyny (źródło: królik, Sigma-Aldrich) rozpuszczone w odtłuszczonym mleku w proporcji 1:50000. Przeciwciała II-rzędowe były sprzężone z peroksydazą chrzanową (HRP). Inkubację z przeciwciałami II-rzędowymi przeprowadzano w temperaturze pokojowej na kołysce laboratoryjnej przez 60 minut. Po zakończonej inkubacji odpłukiwano przeciwciała II-rzędowe poprzez trzykrotne 10-minutowe przemywanie membrany buforem TBS na kołysce laboratoryjnej w temperaturze pokojowej.

Reakcje chemiluminescencji wywoływano stosując gotowy zestaw Immun-Star<sup>TM</sup>Western C<sup>TM</sup> Chemiluminescent Kit (Bio-Rad) zgodnie z zaleceniami producenta. Roztwór odczynnika nakraplano na membranę z białkami i inkubowano 5min w temperaturze pokojowej. Przeprowadzano 1-godziną ekspozycję membrany z kliszą fotograficzną w ciemni. Kliszę wywoływano przy pomocy aparatu AGFA Curix-60 cp 1000.

- **Mikroskopowa analiza jąder komórkowych**

Analizę jąder komórkowych przeprowadzano na komórkach fibroblastów i cybryd. Komórki w ilości  $1 \times 10^4$  wysiewano na szalki ze szklanym dnem ( $\mu$ -Dish 35mm high, Ibidi), w celu dokładniejszych obserwacji mikroskopowych. Komórki pozostawiono na 3-4 dni aby zarosły szalki, po czym inkubowano 24 godziny w pełnej pożywce hodowlanej, pożywce pozbawionej glukozy uzupełnianej 5mM galaktozą lub pożywce pełnej uzupełnianej 2,5 $\mu$ M rotenonem. Po tym czasie odciągano pożywkę, przepłukiwano hodowlę PBS i barwiono komórki barwnikiem Hoechst 33342 (wchodzącym w skład zestawu Cyto-ID® Autophagy Detection Kit, Enzo Life Sciences) umożliwiającym wizualizację jąder komórkowych (barwią się na niebiesko), zgodnie z zaleceniami producenta. Komórki obserwowano z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX 81, przy pomocy obiektywu 60x i filtra DAPI przy czasie naświetlania 90ms.

### **3.2.9.3 Analiza autofagii**

Analizę procesu autofagii w wyprowadzonych liniach komórkowych przeprowadzono dwiema metodami:

- analiza białek markerowych autofagii:
  - dwie izoformy białka LC3: LC3-I (18kDa) i LC3-II (16kDa)
  - białko p62 (62kDa)
- analiza formowania się autofagosomów i autofagolizosmów

Analizę autofagii prowadzono na lizatach białkowych z komórek hodowanych przez 24 godziny w następujących warunkach hodowlanych:

- w pożywce pełnej
- w pożywce pozbawionej glukozy suplementowanej D-galaktozą (Sigma-Aldrich), w końcowym stężeniu 5mM
- w pożywce pełnej suplementowanej rotenonem (Sigma-Aldrich), w końcowym stężeniu 2,5μM

- **Analiza białek markerowych autofagii**

Analizę białek markerowych autofagii przeprowadzono metodą western blot z przeciwciałami skierowanymi przeciwko dwóm izoformom białka LC3: LC3-I i LC3-II oraz przeciwko białku p62. Proces uzyskiwania preparatów białkowych do analizy i przeprowadzania metody western blot przebiegał w identyczny sposób jak opisano w rozdziale 3.2.9.2 z pewnymi modyfikacjami:

- do rozdzielania białek LC3-I i LC3-II wykorzystano żel 15% (15% żel rozdzielający i 4% żel zagęszczający), a do rozdzielania białka p62 żel 12% (12% żel rozdzielający i 4% żel zagęszczający)
- po elektroforezie przenoszono białka na membranę nitrocelulozową Protran Nitrocellulose BA83 Membrane o porach wielkości 0,2μm (Whatman™).
- do transferu mokrego białek na membranę użyto buforu, który przygotowano poprzez rozpuszczenie CAPS (Sigma-Aldrich) w ddH<sub>2</sub>O (10mM CAPS pH 11), aby ułatwić transfer małych białek.
- transfer prowadzono w aparacie MiniPROTEAN Tetra Handcast System (Bio-Rad) z użyciem zestawu do transferu Mini-Trans Blot Cell (Bio-Rad) umieszczonym w lodzie, przy natężeniu 300mA przez 60 min dla białka LC3 i przy natężeniu 400mA przez 90 minut dla białka p62.

Dalsze etapy procedury przebiegały analogicznie do tych opisanych w rozdziale 3.2.9.2.

Membranę inkubowano z przeciwciałami I-rzędowymi anti-LC3 (źródło: przeciwciała królicze, Sigma-Aldrich) i anti-p62 (źródło: przeciwciała królicze, Sigma-Aldrich) rozcieńczonymi 1:1000 w 5% odtłuszczonego mleku, oraz przeciwciałami I-rzędowym anti-β-aktyna (źródło: przeciwciała mysie, Sigma-Aldrich) rozcieńczonymi 1:5000. Do detekcji wyżej wymienionych białek wykorzystano przeciwciała II-rzędowe sprzężone

z HRP. W celu wykrycia dwóch izoform białka LC3 i białka p62 wykorzystano przeciwciała anty-królicze (źródło: koza, Sigma-Aldrich) rozpuszczone w 5% odłuszczonego mleku w proporcji 1:10000 i w celu wykrycia  $\beta$ -aktyny anty-mysie (źródło: królik, Sigma-Aldrich) rozpuszczone 5% odłuszczonego mleku w proporcji 1:50000. Detekcję białek wykonano jak opisano w rozdziale 3.2.9.2. Przedmiotem analizy była proporcja między izoformami LC3-I i LC3-II oraz poziom białka p62.

- **Analiza formowania się autofagosomów i autofagolizosomów**

Analiza formowania się autofagosomów i autofagolizosomów polegała na mikroskopowej wizualizacji tych wakuol. Do detekcji formujących się wakuol autofagosomalnych wykorzystano zestaw Cyto-ID® Autophagy Detection Kit (Enzo Life Science). Komórki w ilości  $1 \times 10^4$  wysiewano na szalki ze szklanym dnem ( $\mu$ -Dish 35mm high, Ibidi), w celu dokładniejszych obserwacji mikroskopowych. Komórki pozostawiono na 3-4 dni aby zarosły szalki, po czym dodawano różne media hodowlane na 24 godziny. Po tym czasie odcinano pożywkę, przepłukiwano hodowlę PBS i barwiono komórki zielonym barwnikiem wchodzącym w skład zestawu Cyto-ID® Autophagy Detection Kit zgodnie z zaleceniami producenta (wakuole autofagosomalne barwią się na zielono). Komórki obserwowano z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX 81, przy pomocy obiektywu 60X, filtru FITC przy czasie naświetlania 850ns.

#### **3.2.9.4 Analiza produkcji wolnych rodników tlenowych**

Do badania produkcji wolnych rodników tlenowych w liniach komórkowych fibroblastów i cybryd wykorzystano zestaw ROS/RNS Detection Kit for fluorescence microscopy (Enzo Life Sciences).

Komórki w ilości  $2 \times 10^4$  wysiewano na szalki ze szklanym dnem ( $\mu$ -Dish 35mm high, Ibidi), w celu dokładniejszych obserwacji mikroskopowych. Komórki pozostawiono na 3-4 dni, aby zarosły szalki, po czym hodowlę inkubowano 24 godziny w pełnej pożywce hodowlanej suplementowanej rotenonem (Sigma-Aldrich) w stężeniu końcowym  $2,5 \mu\text{M}$  w celu indukcji stresu oksydacyjnego. Analogicznie te same próbki w dwóch powtórzeniach hodowano na pożywce pełnej bez rotenonu (kontrola). Po 24 godzinnej inkubacji usuwano pożywkę i dwie szalki dla każdej z badanych hodowli (rosnące w pożywce z rotenonem

i jedną bez rotenonu) zalewano mieszaniną barwników z zestawu ROS/RNS Detection Kit według zaleceń producenta i inkubowano komórki w tych warunkach przez 2 godziny. Po tym czasie usuwano barwnik, przepłukiwano komórki dwukrotnie buforem płuczającym i obserwowano z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX 81 przy pomocy obiektywu 20x i filtrów zgodnych z barwnikami fluoresceiną (dla ROS) i Texas Red (dla rodnika ponadtlenkowego) przy czasie naświetlania 2000ms. Badanie przeprowadzono w trzech wariantach:

- komórki traktowane 2,5μM rotenonem/24godz. + odczynnik barwiący
- komórki nietraktowane rotenonem + odczynnik barwiący w celu oceny fluorescencji podstawowej
- komórki nietraktowane rotenonem i nietraktowane odczynnikami barwiącymi w celu oceny autofluorescencji

### **3.2.9.5 Analiza obecności transkryptów genów mitochondrialnych z mutacjami LHON**

Analizę obecności transkryptów genów, w których lokują się mutacje LHON m.11778G>A i m.3460G>A przeprowadzono na RNA wyizolowanym z linii komórkowych limfoblastów, fibroblastów i cybryd z wykorzystaniem techniki northern blot.

- **Izolacja całkowitego RNA z hodowli komórkowych**

Komórki przemywano roztworem PBS (Sigma-Aldrich), odklejało z zastosowaniem trypsyny (Sigma-Aldrich) i wirowano, w celu otrzymania osadu komórkowego. Osad komórkowy ponownie przemywano PBS i rozpuszczano w 1ml trizolu (Tri<sup>®</sup>Reagent, Sigma-Aldrich) w celu lizy komórek. Rozpuszczony pelet inkubowano 5min w temperaturze pokojowej (RT). Następnie do lizatu dodano 0,2ml chloroformu (Sigma-Aldrich) i wytrząsano 2-3min, po czym ponownie inkubowano 10min w RT. Po tym czasie wirowano 15min/12000g w temperaturze 4<sup>0</sup>C. Po wirowaniu fazę wodną przenoszono do nowej probówki, dodawano 0,5ml izopropanolu (Sigma-Aldrich), wymieszano przez odwracanie, inkubowano 10min w RT po czym ponownie wirowano 10min/12000g w temperaturze 4<sup>0</sup>C. Po wirowaniu usunięto supernatant, dodano 0,9ml 75% etanolu i przepipetowano w celu przepłukania RNA. Inkubowano 5min w RT po czym zwirowano kilkanaście sekund i usunięto etanol. Pelet RNA suszono około 10min w otwartych probówkach w RT. W miarę suszenia osad RNA robił się przeźroczysty. Po wysuszeniu rozpuszczano osad RNA

w wodzie z dodatkiem 0,1% (v/v) pirowęglań dietylu (DEPC) w celu inaktywacji enzymów degradujących RNA. Rozpuszczony pelet inkubowano 5min w RT. Gotowe wyizolowane próbki RNA przechowywano w -80°C.

- **Rozdział elektroforetyczny i transfer RNA**

Wszystkie odczynniki niezbędne do przeprowadzenia techniki northern blot przygotowano w wodzie z dodatkiem 0,1% (v/v) DEPC.

10µg RNA każdej z próbek rozdzielano w 1% żelu agarozowym z dodatkiem formaldehydu (1ml 37% formaldehydu na każde 40ml żelu). Agarozę rozpuszczano w buforze 1xNBC (10xNBC: 0,5 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 10 mM CH<sub>3</sub>COONa; 50 mM NaOH). Preparat RNA zawieszano w końcowej objętości 5µl H<sub>2</sub>O+DEPC i dodawano do niego roztwór denaturujący składający się z 2µl buforu 10xNBC, 3µl formaldehydu i 10µl formamidu. Następnie ogrzewano próbki w 65°C/5min i do każdej próbki dodawano 2µl buforu obciążającego [15% (w/v) Ficoll; 0,1M EDTA pH 8; 0,25% (w/v) błękit bromofenolowy; 0,25% (w/v) cyjanol ksylenu] i poddawano 90-minutowemu rozdziałowi elektroforetycznemu przy napięciu 100V. Po elektroforezie przenoszono RNA na filtr nylonowy Nytran<sup>®</sup>N (Whatman<sup>™</sup>) o porach wielkości 0,45µm za pomocą transferu kapilarnego z wykorzystaniem buforu 20xSSC (0,3M C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>, 3M NaCl). Po nocnym transferze RNA wiązano do filtra w aparacie UV Crosslinker (UVC500 Hoefer) przy zastosowaniu energii 100 µJ/cm<sup>2</sup>, a związane RNA wybarwiano roztworem błękitu metylenu [0,02% (w/v) błękit metylenu; 0,3M octan sodu pH 5,2]. Nadmiar barwnika odpłukiwano H<sub>2</sub>O.

- **Przygotowanie sond, hybrydyzacja i detekcja zhybrydowanej sondy**

Sondy oligonukleotydowe do detekcji wybranych transkryptów genów mtDNA, w których lokują się mutacje LHON przygotowano za pomocą techniki PCR z wykorzystaniem całkowitego DNA. Do amplifikacji fragmentów DNA, w których lokują się geny *ND1* i *ND4* zastosowano startery przedstawione w tabeli 18. Startery do amplifikacji DNA w celu uzyskania sond otrzymano od dr Romana Szczęsnego.

**Tabela 18.** Sekwencja starterów użytych do amplifikacji DNA służącego do konstrukcji sond oligonukleotydowych do detekcji transkryptów z genów mitochondrialnych *ND1* i *ND4* w analizie northern blot.

wykrywany RNA	oznaczenie startera	sekwencja startera 5'-3'
ND1	RSZ262	ATCCTCTGATCAGGGTGAG
	RSZ263	GATTGTAGTGGTGAGGGTG
ND4	RSZ282	GCTATCATCACCCGATGAG
	RSZ283	ATAGTACAAGGAAGGGGTAG

Produkty reakcji PCR rozdzielano na 1% żelu agarozowym i izolowano za pomocą zestawu GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Tak przygotowane sondy oligonukleotydowe znakowano izotopem [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dATP (Hartmann Analytic) przy użyciu zestawu DecaLabel DNA labeling kit (Fermentas) zgodnie z zaleceniami producenta. Sondy denaturowano przez dodanie 100 mM NaOH w temperaturze pokojowej.

Prehybrydyzację membrany z RNA prowadzono w buforze PerfectHyb<sup>TM</sup> Plus (Sigma-Aldrich) w temperaturze 65°C przez 30 minut po czym dodawano jedną z gotowych zdenaturowanych, wyznakowanych izotopem sond. Hybrydyzację membrany z sondą prowadzono przez noc w 65°C. Następnego dnia membranę płukano przez 10 minut w roztworze do płukania I [0,1% (w/v) SDS, 2xSSC] i roztworem II [0,1% (w/v) SDS, 0,2 x SSC). Membranę poddano ekspozycji przez noc na ekranie fosforowym (Hypercassette<sup>TM</sup>, Amersham Biosciences). Obraz odczytano za pomocą urządzenia Fujifilm Phosphoimager, FLA-7000. Membranę hybrydyzowano najpierw z sondą dla genu *ND1*, a następnie sondę odpłukiwano gorącym roztworem 0,1% SDS i hybrydyzowano z sondą dla genu *ND4*.

### 3.2.9.6 Analiza oddychania komórkowego

Analizy oddychania komórkowego z wykorzystaniem oksygrafu (Oxygraph-2k Oroboros) wykonano w Pracowni Metabolizmu Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego.

Analizę oddychania przeprowadzono na liniach komórkowych limfoblastów, fibroblastów i cybryd. Komórki fibroblastów i cybryd płukano PBS, trypsynizowano, aktywność trypsyny hamowano dodając pełną pożywkę hodowlaną z 10% FBS, następnie komórki wirowano (5min/1200g), płukano PBS i ponownie wirowano. Odciągano PBS znad



osadu komórkowego, a pelet rozpuszczano w 2,1ml PBS z dodatkiem  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  (odczynnik wyprodukowany w Pracowni Chemii Ogólnej Instytutu Immunologii Terapii Doświadczalnej PAN) i nanoszono do komór oksygrafu, które wcześniej skalibrowano PBS z dodatkiem  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ . Pomiary oddychania komórkowego, mierzonego szybkością zużycia tlenu w czasie dokonywano na czterech następujących etapach:

- 1) szybkość podstawowego zużycia tlenu (przed dodaniem substratów oddechowych)
- 2) szybkość zużycia tlenu po dodaniu substratów oddechowych  
(pirogronian w końcowym stężeniu 1mM + glutaminian w końcowym stężeniu 5mM)
- 3) szybkość zużycia tlenu po dodaniu inhibitora syntazy ATP  
(oligomycyna w końcowym stężeniu 0,1μg/ml). Oligomycyna, to naturalny antybiotyk makrolidowy izolowany ze szczepu *Streptomyces*, który blokuje podjednostkę  $F_0$  kanału protonowego syntazy ATP, uniemożliwiając konwersję ADP do ATP (Shchepina i wsp., 2002).
- 4) szybkość zużycia tlenu po dodaniu rozpręgacza fosforylacji oksydacyjnej  
(cccp w końcowym stężeniu 1μM)

Dla każdej linii komórkowej wykonano cztery niezależne pomiary dla różnych pasażów komórkowych. Po wykonanej analizie zbierano rozpuszczone w PBS komórki w celu oznaczenia stężenia białka w roztworze. Ocenę stężenia białka metodą Lowry'ego wykonano z wykorzystaniem zestawu Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermo Scientific) według zaleceń producenta. Poziom absorbancji badanych próbek oraz próbek o znanym stężeniu przy długości fali 750nm mierzono w czytniku płytek Sunrise Microplate Absorbance Reader. Stężenie białka badanych próbek odczytano z krzywej kalibracyjnej utworzonej z próbek o znanym stężeniu białka.

Wyniki otrzymane z oksygrafu dla każdego pomiaru, każdej z badanych hodowli przeliczono na miligram białka. Końcowe wyniki ilości zużytego tlenu wyrażone w pikomolach przez sekundę czasu na miligram białka podano w jednostkach:  $\frac{\text{pmol}}{\text{s} \cdot \text{mg}}$ .

### **3.2.10 Obliczenia statystyczne**

W analizie istotności otrzymanych wyników wykorzystano test t-Studenta. Do obliczeń testu t-Studenta wykorzystano program do obliczeń statystycznych GraphPad dostępny na stronie internetowej: [www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1](http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1) oraz program SISA (ang. *Simple Interactive Statistical Analysis*) dostępny na stronie internetowej: <http://www.quantitativeskills.com/sisa/statistics/t-test.htm>.

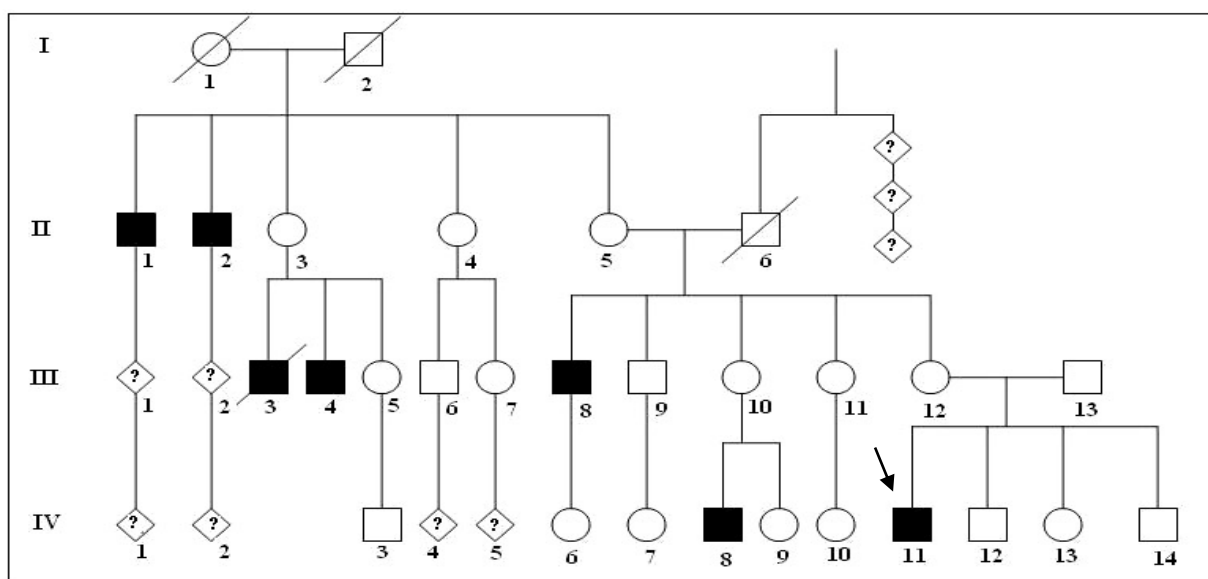


## 4. WYNIKI

### 4.1 Poszukiwanie rzadkich mutacji mtDNA prowadzących do zaniku nerwu wzrokowego

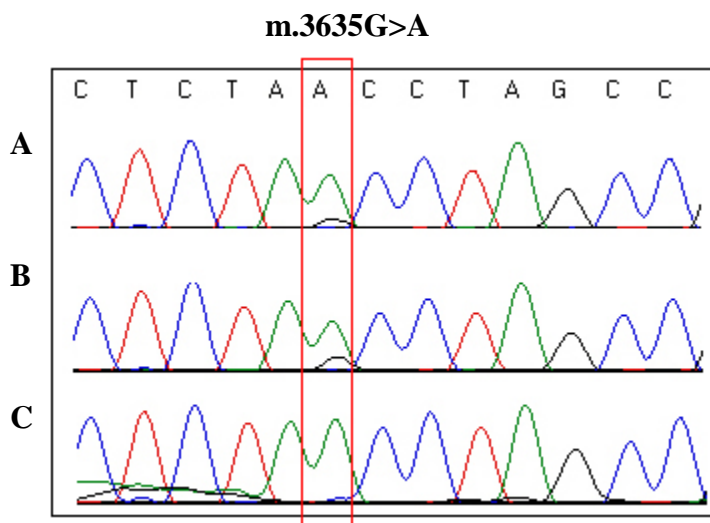
- **Analiza mutacji mitochondrialnej m.3635G>A**

Sekwencjonowanie mtDNA wybranych genów kodujących podjednostki kompleksu I łańcucha oddechowego (*ND1*, *ND4*, *ND5* i *ND6*) przeprowadzone na materiale genetycznym wyizolowanym z krwi 17-letniego probanda (oznaczonego na rodowodzie strzałką) z objawami zaniku nerwu wzrokowego oraz jego krewnych, zdrowej matki probanda i chorego kuzyna probanda spokrewnionego z nim w linii matczynej, miało na celu znalezienie mutacji przyczyniającej się do ekspresji fenotypowej LHON. Rodowód rodziny probanda przedstawiono na rysunku 12.



**Rysunek 12. Rodowód rodziny probanda z objawami zaniku nerwu wzrokowego o nieznanej etiologii** (proband oznaczony strzałką). Analizę genetyczną wykonano na materiale wyizolowanym z krwi następujących osób: IV-11 (proband), IV-8 (chory kuzyn probanda) i III-12 (zdrowa matka probanda).

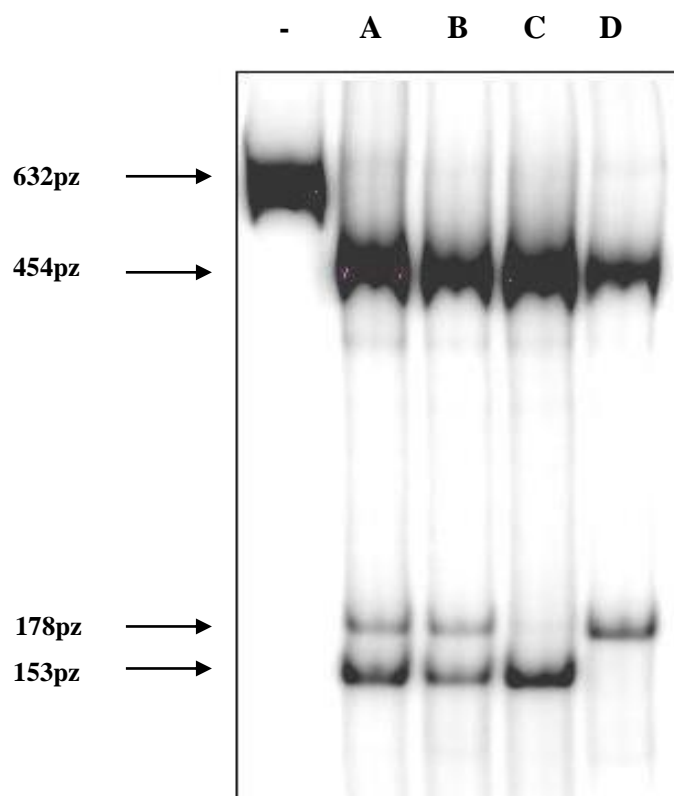
Szczegółowa analiza genetyczna dostępnego materiału pozwoliła na zidentyfikowanie rzadkiej mutacji mitochondrialnej w pozycji 3635 w genie *ND1* mtDNA u wszystkich badanych osób, która skutkowałą substytucją guaniny adeniną (3635G>A). Wyniki sekwencjonowania w postaci elektroforegramów z zaznaczoną mutacją m.3635G>A przedstawiono na rysunku 13.



**Rysunek 13. Elektroforegramy regionów otaczających mutację m.3635G>A w mtDNA.**

Czerwonym prostokątem zaznaczono miejsce występowania mutacji m.3635G>A. Obecność mutacji m.3635G>A w formie heteroplazmatycznej potwierdzono w mtDNA wyizolowanym z krwi matki probanda (A) oraz kuzyna z linii matczynej probanda (B), natomiast w mtDNA wyizolowanym z krwi probanda mutacja ta występowała w formie homoplazmatycznej (C).

W celu określenia poziomu heteroplazmii tej mutacji wykonano analizę ilościową opartą na znakowaniu radioaktywnym w ostatnim cyklu PCR połączoną z analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *last-cycle hot PCR-RFLP*). Za pomocą reakcji PCR amplifikowano region otaczający kodon 110 genu *ND1*. Produkty reakcji amplifikacji długości 632pz wyznakowano izotopowo, a następnie poddano trawieniu endonukleazą restrykcyjną *TruII*. Produkty trawienia rozdzielano w 12% żelu poliakryloamidowym i rejestrowano na kliszy. Sekwencja bez mutacji ulega cięciu na dwa fragmenty długości 454pz i 178pz. Mutacja m.3635G>A wprowadza nowe miejsce restrykcyjne dla *TruII* i w wyniku cięcia endonukleazą otrzymujemy trzy fragmenty o długości 454pz, 153pz i 25pz. Analiza ilościowa wykonana w programie Multi Gauge V3.0 wykazała, że chory proband posiadał mutację m.3635G>A w formie homoplazmatycznej, natomiast jego chory kuzyn, spokrewniony z nim w linii matczynej posiadał mutację w formie heteroplazmatycznej, a poziom heteroplazmii wyniósł  $67\% \pm 0,5$ . Poziom heteroplazmii tej mutacji we krwi matki probanda wyniósł  $72\% \pm 0,1$ . Wyniki analizy poziomu heteroplazmii m.3635G>A przedstawiono na rysunku 14.



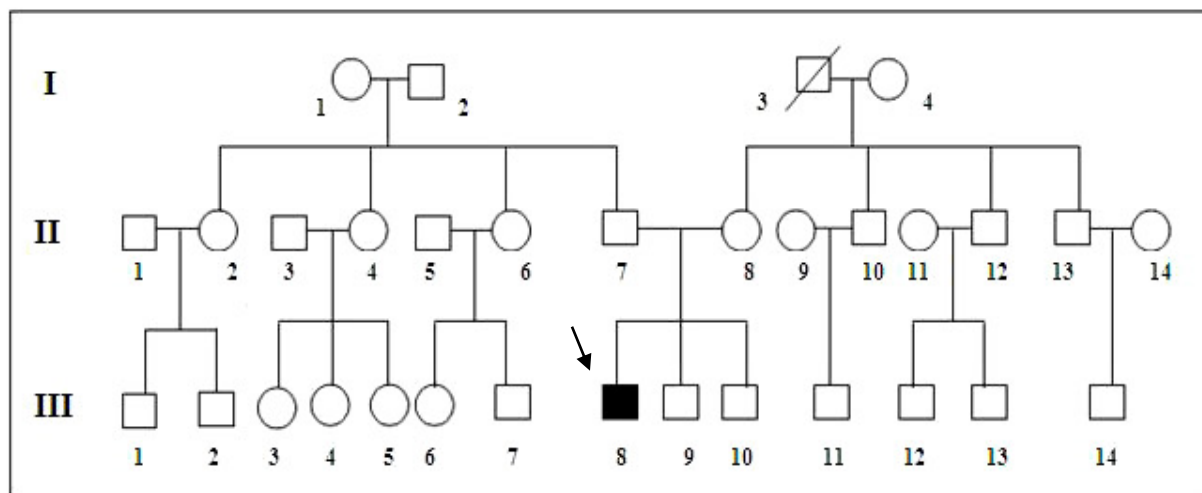
**Rysunek 14. Analiza PCR-RFLP mutacji m.3635G>A.** Sekwencja bez mutacji ulega cięciu endonukleazą *TruII* na dwa fragmenty długości 454pz i 178pz. m.3635G>A wprowadza nowe miejsce restrykcyjne, a w wyniku cięcia endonukleazą otrzymujemy trzy fragmenty o długości 454pz, 153pz i 25pz (prążek dla 25pz nie jest ujęty na rysunku). DNA wyizolowany z krwi: A - matki probanda, B - kuzyna probanda, C - probanda, D - osoby bez mutacji (kontrola negatywna), (-) DNA nietrawiony endonukleazą.

Analiza polimorfizmów regionu pętli D mtDNA probanda wykazała obecność polimorfizmów 16069C>T i 16126T>C, pozwalających zakwalifikować probanda do mitochondrialnej haplogrupy J (MITOMAP).

- **Analiza mutacji mitochondrialnej m.13042G>A**

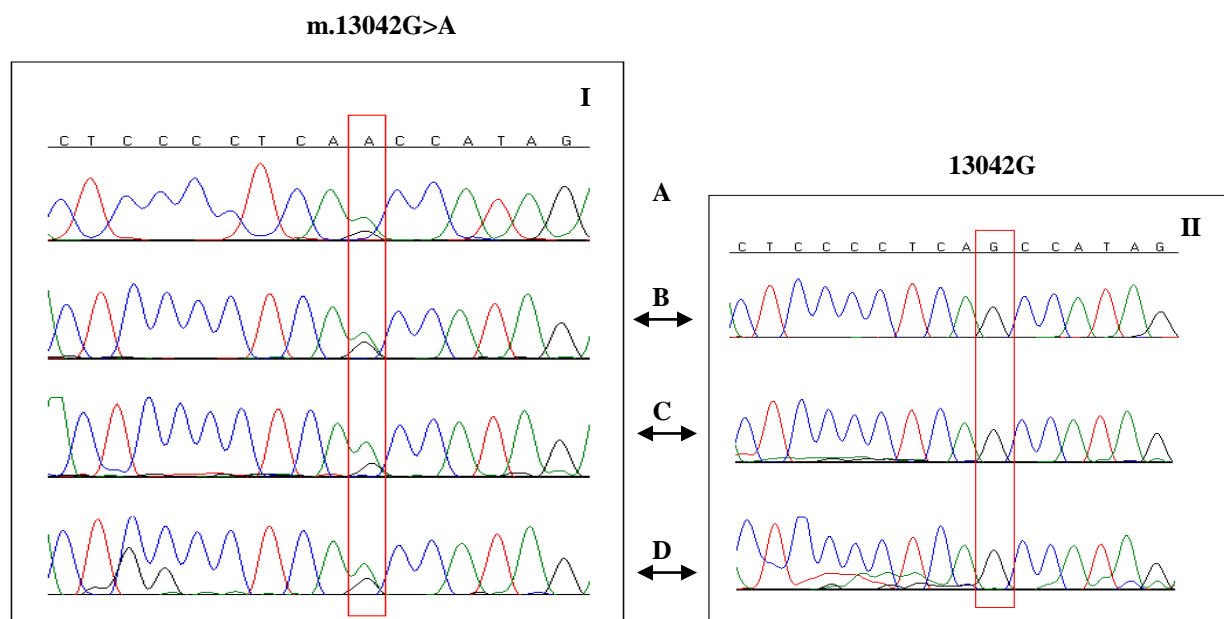
Na podstawie dysfunkcji układu nerwowego i diagnozy zaniku nerwu wzrokowego u 24-letniego probanda wysunięto przypuszczenie, że objawy te mogą być wynikiem choroby mitochondrialnej, dlatego postanowiono u niego wykonać analizę genetyczną w kierunku najczęstszych encefalomiopatii mitochondrialnych MERRF, MELAS i NARP oraz diagnostykę LHON. Diagnostyka w kierunku encefalomiopatii mitochondrialnych oraz poszukiwanie podstawowych mutacji odpowiedzialnych za LHON wykonana przez dr hab. Katarzynę Tońską dała wynik negatywny, dlatego zdecydowano

o zsekwencjonowaniu całego genomu mitochondrialnego, które przeprowadzono w ramach przedstawionej rozprawy. Rodowód rodziny probanda przedstawiono na rysunku 15.



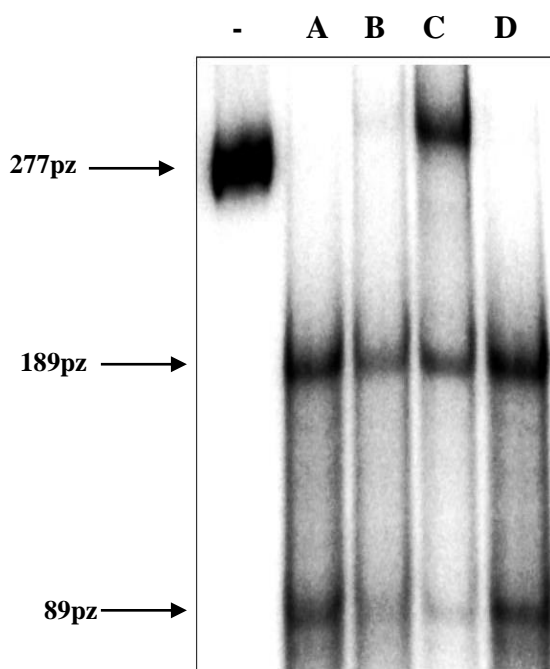
**Rysunek 15. Rodowód rodziny probanda z szerokim spektrum objawów neurologicznych oraz zanikiem nerwu wzrokowego o nieznanej etiologii (proband oznaczony strzałką).** Analizę genetyczną przeprowadzono na DNA wyizolowanym z różnych tkanek probanda (III-8) oraz jego matki (II-8).

Sekwencjonowanie całego mtDNA umożliwiło wykrycie obecności kilku powszechnych polimorfizmów, jednej zmiany patogenicznej w stanie heteroplazmatycznym w genie *ND5* (13042G>A) oraz dwóch zmian o nieznanej patogeniczności w postaci homoplazmatycznej (4315A>G/tRNA<sup>Ile</sup>, 15917C>T/tRNA<sup>Thr</sup>). Analiza sekwencji genu *ND5* w DNA izolowanym z biopsatu mięśnia szkieletowego, z cebulek włosów, komórek krwi i nabłonka dróg moczowych probanda oraz izolowanym z cebulek włosów, komórek krwi i nabłonka dróg moczowych jego zdrowej matki potwierdziła obecność mutacji m.13042G>A w stanie heteroplazmatycznym w DNA izolowanym ze wszystkich analizowanych tkanek probanda natomiast mutacja ta była nieobecna w DNA wyizolowanym z tkanek jego matki. Dwa pozostałe zidentyfikowane warianty (4315A>G, 15917C>T) stwierdzono w DNA wyizolowanym zarówno z tkanek pacjenta jak i jego matki. Wyniki sekwencjonowania genu *ND5* przeprowadzone na DNA wyizolowanym z różnych tkanek probanda i jego matki przedstawiono w postaci elektroforegramów na rysunku 16.



**Rysunek 16. Elektroforegramy regionów otaczających mutację 13042G>A w mtDNA probanda (I) i jego matki (II).** Obecność mutacji m.13042G>A w stanie heteroplazmatycznym została potwierdzona w materiale genetycznym wyizolowanym z mięśnia szkieletowego, cebulek włosów, krwi i nabłonka dróg moczowych probanda (I), natomiast mutacji tej nie wykryto w materiale genetycznym wyizolowanym z cebulek włosów, komórek krwi oraz nabłonka dróg moczowych matki probanda (II). DNA wyizolowany z: A - mięśnia szkieletowego, B - cebulek włosów, C - krwi, D - nabłonka dróg moczowych.

Analizę poziomu heteroplazmii mutacji m.13042G>A określono na DNA wyizolowanym z krwi i mięśnia szkieletowego probanda. Sprawdzone również ponownie, czy mutacja ta znajduje się w DNA z krwi matki probanda. W celu analizy stopnia heteroplazmii mutacji wykonano analizę ilościową opartą na znakowaniu radioaktywnym w ostatnim cyklu PCR połączoną z analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych. Za pomocą reakcji PCR amplifikowano region otaczający kodon 236 genu *ND5*. Produkty reakcji amplifikacji długości 277pz wyznakowano izotopowo, a następnie poddano trawieniu restrykcyjnemu endonukleazą restrykcyjną *BbvCI*. Produkty trawienia rozdzielano w 12% żelu poliakryloamidowym i rejestrowano na kliszy. Sekwencja bez mutacji ulega cięciu na dwa fragmenty o długości 189pz i 89pz. m.13042G>A powoduje eliminację miejsca restrykcyjnego rozpoznawanego przez endonukleazę *BbvCI*. Analiza ilościowa wykonana w programie Multi Gauge V3.0 wykazała, że stopień heteroplazmii m.13042G>A wyniósł  $29,8\% \pm 1,7$  w DNA krwi probanda, a w DNA z mięśnia szkieletowego wyniósł  $68,9\% \pm 1,8$ . Mutacji tej ponownie nie wykryto w komórkach krwi matki probanda. Wyniki analizy stopnia heteroplazmii mutacji 13042G>A przedstawiono na rysunku 17.



**Rysunek 17. Analiza PCR-RFLP mutacji m.13042G>A.** Sekwencja bez mutacji ulega cięciu endonukleazą *BbvCI* na dwa fragmenty długości 189pz i 89pz. m.13042G>A powoduje zanik miejsca restrykcyjnego i otrzymuje się prążek o długości 277pz. DNA wyizolowany z: A - krwi osoby bez mutacji (kontrola negatywna), B - krwi probanda, C - mięśnia szkieletowego probanda, D - krwi matki probanda, (-) DNA nietrawiony endonukleazą.

Analiza sekwencji całego genomu mitochondrialnego probanda umożliwiła wykrycie polimorfizmu C7028C, charakterystycznego dla mitochondrialnej haplogrupy H. Nie wykryto polimorfizmów charakterystycznych dla pozostałych haplogrup europejskich, co pozwoliło zakwalifikować badanego probanda do haplogrupy H (MITOMAP).

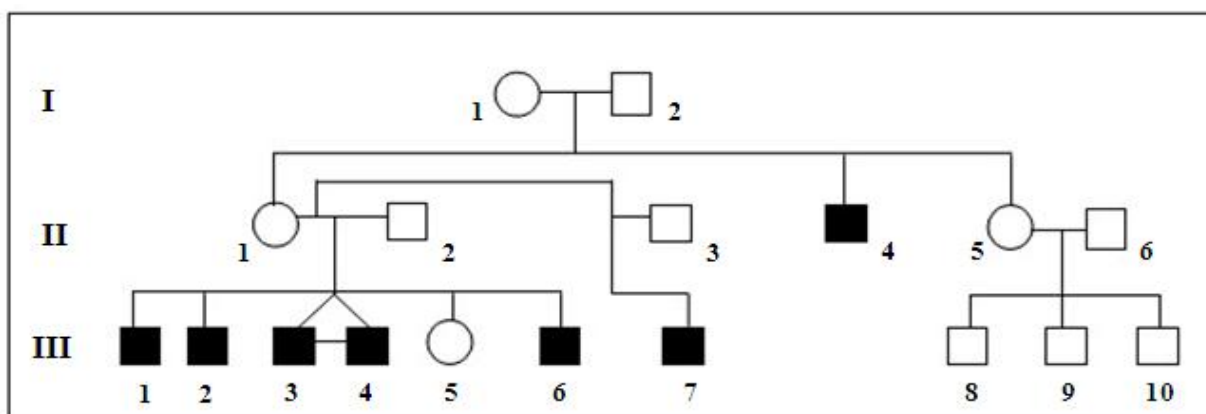
#### **4.2 Wyprowadzenie linii komórkowych od pacjentów z m.11778G>A i**

**m.3460G>A oraz od osób bez mutacji mitochondrialnych: linie**

**limfoblastów, fibroblastów i hybryd transmitochondrialnych (cybryd)**

W celu wykonania analiz genetycznych i biochemicznych na komórkach pacjentów z dwiema mutacjami LHON (m.11778G>A i m.3460G>A) pobrano od nich krew i biopaty skóry. Krew pobrano także od jednej zdrowej nosicielki mutacji m.11778G>A oraz od zdrowych osób bez mutacji mitochondrialnych stanowiących grupę kontrolną. Otrzymane materiały biologiczne posłużyły do wyprowadzenia linii komórkowych. Z krwi pacjentów wyizolowano komórki mononuklearne, które unieśmiertelniano wirusem Epsteina-Barr.

Biopłaty skóry posłużyły do wyprowadzenia linii komórkowych fibroblastów i skonstruowania hybryd mitochondrialnych (cybryd). Cybrydy skonstruowano w celu ujednolicenia tła jądrowego i ułatwienia oceny wpływu genomu mitochondrialnego na metabolizm komórek. 6 linii komórkowych fibroblastów od zdrowych osób pozbawionych mutacji mitochondrialnych otrzymano od dr Aleksandry Sołtygi-Żurek, która wyprowadzała linie komórkowe fibroblastów od zdrowych osób w celu realizacji badań w ramach swojej pracy doktorskiej. Rodowód rodziny z dwiema mutacjami LHON przedstawiono na rysunku 18. Liczbę poszczególnych linii komórkowych wyprowadzonych od pacjentów z mutacjami LHON i osób z grupy kontrolnej przedstawiono w tabeli 19.



**Rysunek 18. Rodowód rodziny z dwiema mutacjami LHON m.11778G>A oraz m.3460G>A.**

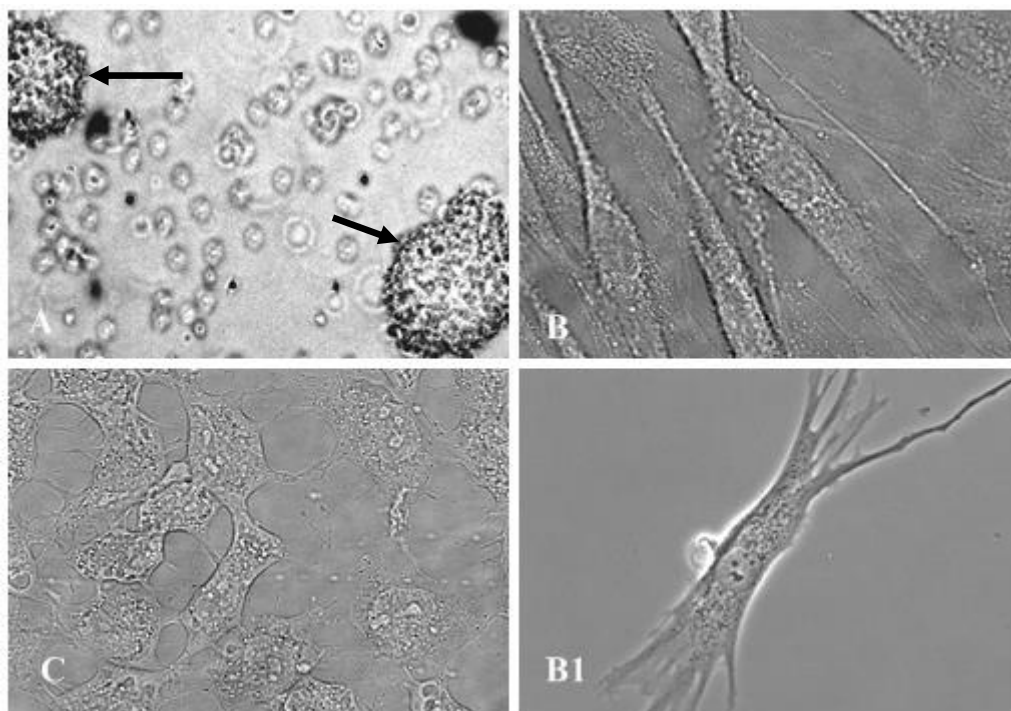
Analizy genetyczne oraz eksperymenty na liniach komórkowych przeprowadzono na materiale izolowanym od następujących pacjentów: III-1, III-3, III-4, III-5, III-6, III-7. W dalszych analizach pacjenci będą oznaczani skrótowo: p.1, p.3, p.4, p.5, p.6 i p.7.

**Tabela 19. Liczebność poszczególnych linii komórkowych wyprowadzonych od pacjentów z mutacjami LHON i osób z grupy kontrolnej.**

linia komórkowa	liczba linii od osób z rodziny z dwiema mutacjami LHON/ zdrowej nosicielki m.11778G>A	liczba linii od osób z grupy kontrolnej (XX - linie żeńskie, XY – linie męskie)
limfoblasty	5/1	5 (2 XX, 3XY)
fibroblasty	6	6 (3XX, 3 XY)
cybrydy	6	6

Przykładowe zdjęcia wyprowadzonych linii komórkowych przedstawiono na rysunku 19.





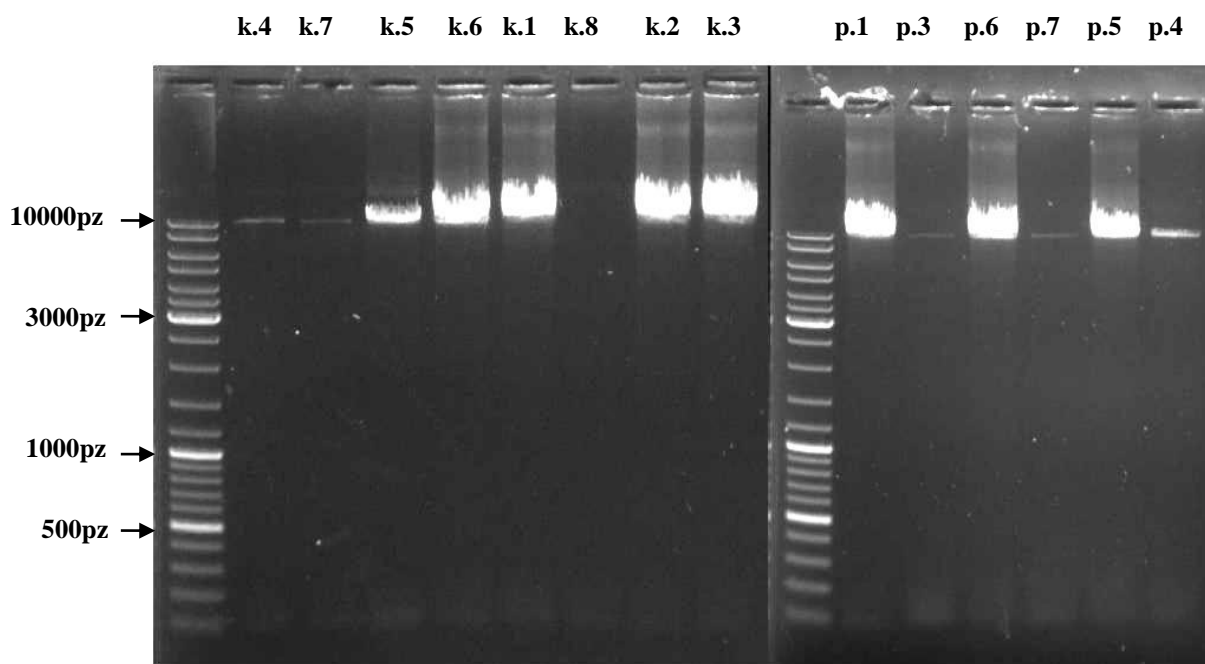
**Rysunek 19. Przykładowe zdjęcia obrazujące komórki linii komórkowych wyprowadzonych od pacjentów z mutacjami LHON oraz osób z grupy kontrolnej.** A - linia komórkowa nieśmiertelnionych limfocytów B (limfoblasty) (strzałkami zaznaczono grudki komórek transformowanych wirusem Epsteina-Barr - ang. „clumps”), B – linia komórkowa fibroblastów, B1 – pojedynczy fibroblast, C – linia komórkowa cybryd.

W celu kontroli procesu cybrydyzacji wykonano kilka analiz, a przedstawione wyniki weszły również w skład pracy magisterskiej Agaty Kulickiej pt.: „Hybrydy transmitochondrialne, jako model komórkowy dziedzicznej neuropatii wzrokowej Lebera”, której byłam opiekunem.

#### a) Analiza z zastosowaniem długiego PCR

Analizę długiego PCR (ang. *long PCR*) wykonano w celu wykrycia mitochondrialnego DNA w komórkach cybryd. Analizę wykonano na całkowitym DNA wyizolowanym ze wszystkich linii cybryd po 10 pasażu. Wynik reakcji *long PCR* przedstawiono na rysunku 20.





**Rysunek 20.** Wynik reakcji *long PCR* dla linii cybryd pacjentów (p.1-p.7) oraz osób z grupy kontrolnej (k.1-k.8). Produkt reakcji *long PCR* migruje na wysokości 9815pz. Dla wszystkich badanych linii oprócz linii k.8 widoczny jest produkt reakcji *long PCR* potwierdzający obecność mtDNA w badanych liniach komórkowych.

W wyniku tej analizy wyeliminowano jedną linię cybryd k.8, w której nie wykryto mtDNA, w pozostałych liniach wykryto obecność mtDNA. Do dalszych analiz wyselekcjonowano 6 linii kontrolnych (k.1-k.6) oraz wszystkie 6 linii z mutacjami LHON.

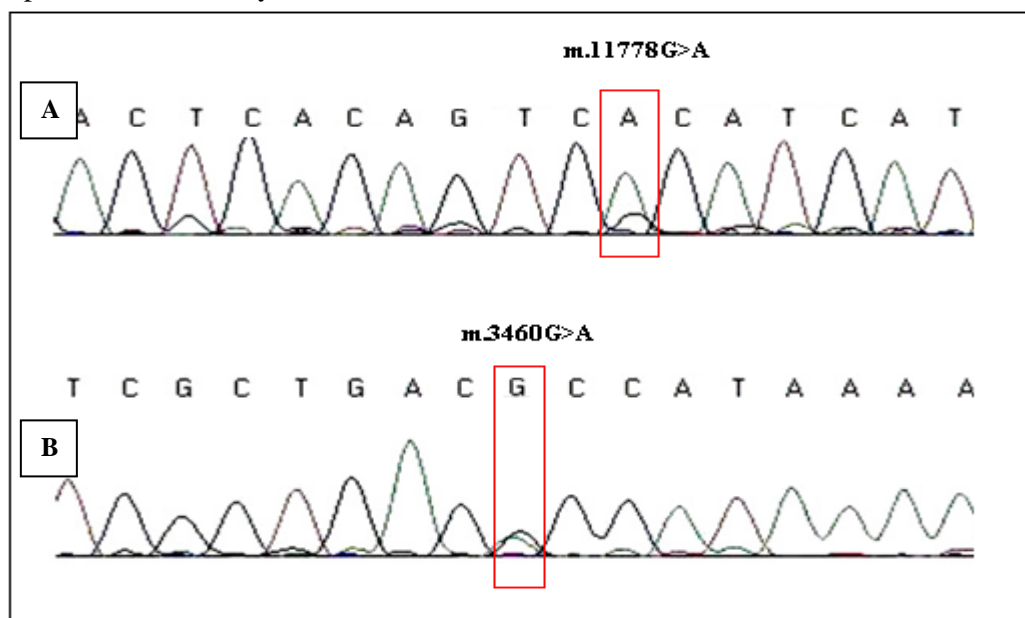
#### b) Sekwencjonowanie fragmentu pętli D

Na DNA wyizolowanym ze wszystkich linii cybryd przeprowadzono reakcję sekwencjonowania obszaru pętli D mtDNA. Miało to na celu określenie zgodności mtDNA z cybryd i tego z komórek fibroblastów. Przeprowadzona analiza wykazała zgodność badanych sekwencji mtDNA.

#### c) Sekwencjonowanie obszarów mtDNA obejmujących mutacje LHON

Na DNA wyizolowanym z cybryd skonstruowanych z fibroblastów pacjentów z dwiema mutacjami LHON przeprowadzono reakcję sekwencjonowania obszarów obejmujących mutacje m.11778G>A i m.3460G>A w celu potwierdzenia obecności tych tranzykcji w badanych liniach komórkowych. Amplifikację fragmentów mtDNA, w których lokują się wyżej wymienione

mutacje przeprowadzono z udziałem reakcji PCR z wykorzystaniem starterów i zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i metody. Przykładowy wynik sekwencjonowania miejsc mutacji w DNA cybryd skonstruowanych z fibroblastów pacjenta p.7 z dwiema mutacjami LHON przedstawiono na rysunku 21.



**Rysunek 21. Wynik analizy sekwencjonowania mtDNA cybryd linii p.7 w miejscach mutacji LHON.** Elektroforegram A przedstawia wynik sekwencjonowania miejsca, w którym lokuje się mutacja m.11778G>A, a elektroforegram B miejsce mutacji m.3460G>A. Obie mutacje występują w formie heteroplazmatycznej.

Analiza wyników sekwencjonowania pozwoliła na wykrycie we wszystkich analizowanych próbkach DNA obu mutacji LHON: m.11778G>A oraz m.3460G>A.

#### d) Analiza profilu jądrowego cybryd, fibroblastów i komórek rho0 143B

Analiza miała na celu wykazanie, że skonstruowane cybrydy posiadają tło jądrowe komórek rho0 143B, a nie fibroblastów, co dodatkowo potwierdzałoby, że linie komórkowe otrzymane w wyniku fuzji komórek enukleowanych fibroblastów z komórkami rho0 143B zawierają wyłącznie komórki cybryd. Analizę przeprowadzono na wszystkich wyselekcjonowanych do dalszych eksperymentów liniach komórkowych cybryd z mutacjami LHON i osób z grupy kontrolnej. W celu oceny zgodności profilu jądrowego cybryd z profilem jądrowym komórek rho0 143B przeprowadzono analizy zgodności trzech markerów jądrowych typu STR (TH01, D21S11, CSF1PO) wchodzących w skład zestawu CODIS, powszechnie stosowanego w celach identyfikacji osobniczej. Wyniki analizy markerów STR dla poszczególnych linii komórkowych oraz przykładowe elektroforegramy dla trzech markerów jądrowych określonych dla DNA wyizolowanego z cybryd

i fibroblastów oraz komórek rho0 143B przedstawiono w suplemencie 2.

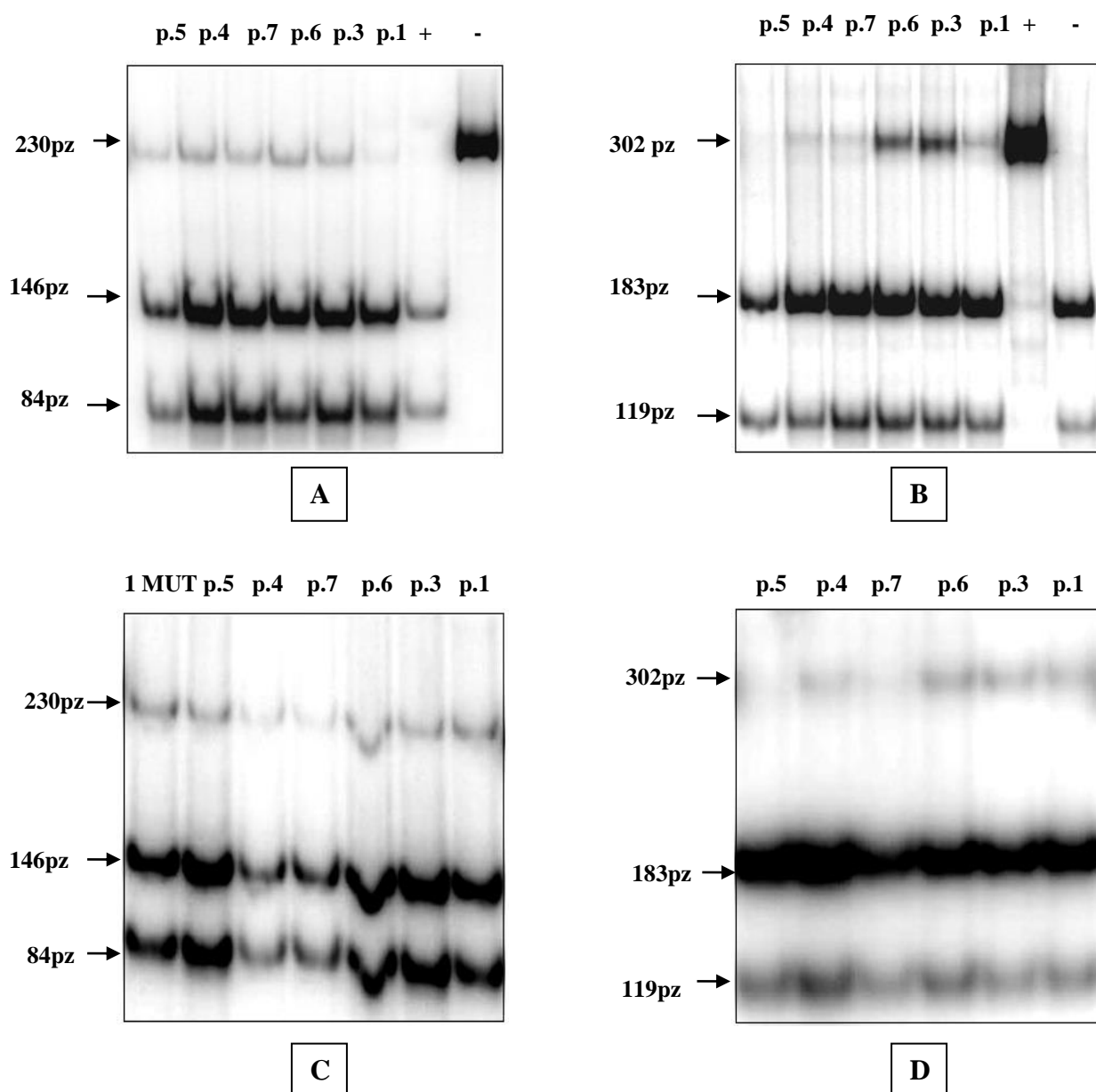
Wyniki analizy profilu jądrowego określonego na podstawie trzech loci STR we wszystkich przypadkach potwierdziły zgodność profilu cybryd z profilem komórek rho0 143B oraz wykazały odmiennność profilu jądrowego fibroblastów w stosunku do cybryd.

#### **4.3 Analiza poziomu heteroplazmii m.11778G>A i m.3460G>A w różnych liniach komórkowych oraz we krwi pacjentów z LHON**

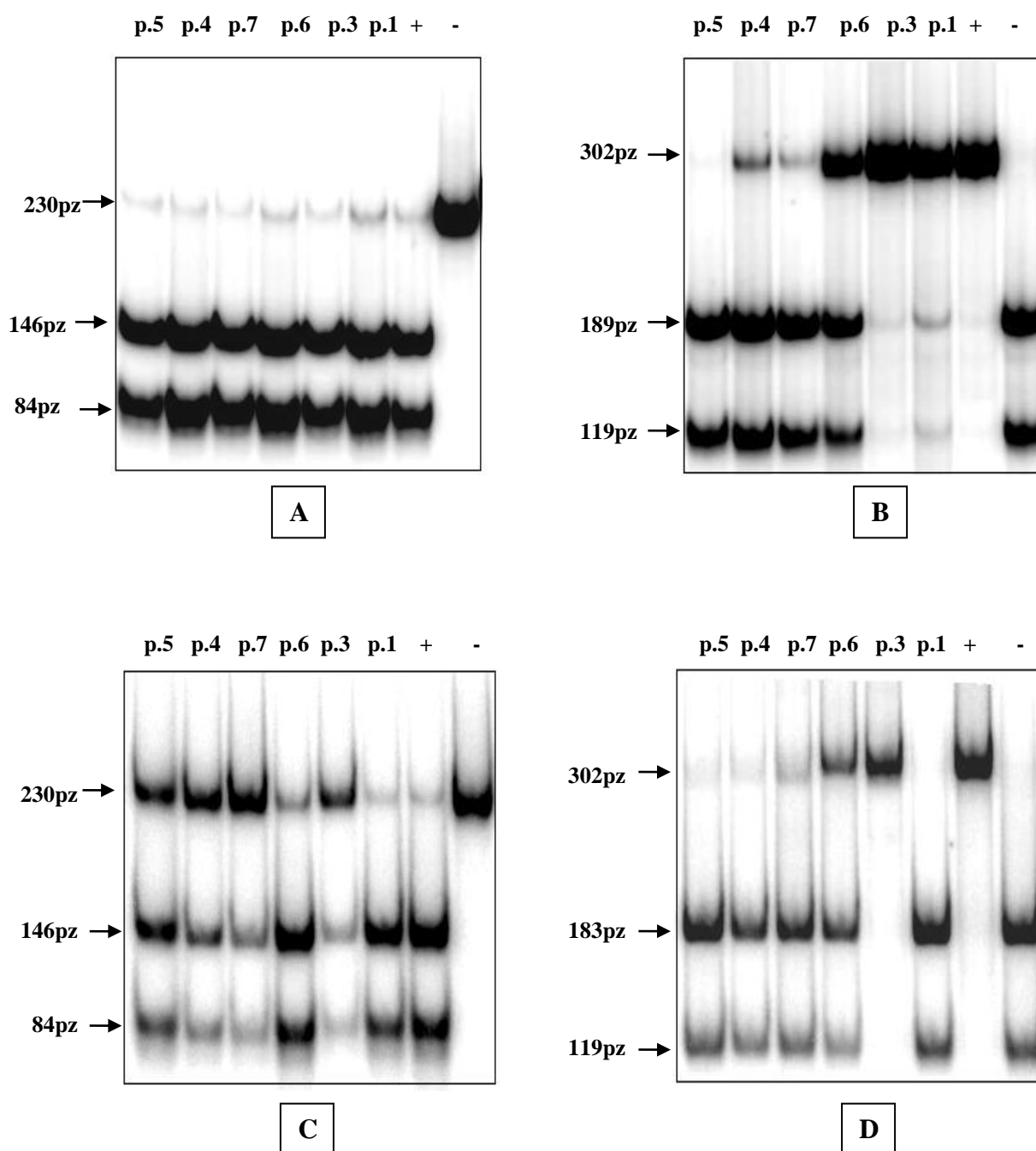
W celu analizy poziomu heteroplazmii mutacji LHON w DNA z wyprowadzonych linii komórkowych (linie limfoblastów, fibroblastów i hybryd transmitochondrialnych-cybryd) oraz w DNA wyizolowanym z krwi wykonano analizę ilościową *last-cycle hot PCR-RFLP*. Za pomocą reakcji PCR amplifikowano obszary mtDNA zawierające dwie wykryte u pacjentów LHON mutacje - m.11778G>A oraz m.3460G>A. Produkty reakcji amplifikacji (długości 230pz dla m.11778G>A oraz 302pz dla m.3460G>A) wyznakowano izotopowo, a następnie poddano trawieniu restrykcyjnemu. Produkty trawienia rozdzielano w 12% żelu poliakryloamidowym i rejestrowano na kliszy. Mutacja m.11778G>A powoduje powstanie miejsca restrykcyjnego dla enzymu *MaeIII* i obserwowane są prążki długości 146pz i 84pz, natomiast m.3460G>A powoduje zanik miejsca trawienia dla enzymu *HinII* i produkt reakcji nie jest cięty endonukleazą. W przypadku braku tej mutacji powstają dwa prążki długości 183pz i 119pz. Wyniki analizy poziomu heteroplazmii obu mutacji LHON w DNA z komórek krwi, limfoblastów, fibroblastów i cybryd przedstawiono odpowiednio na rysunkach 22 i 23. Wyniki analizy poziomu heteroplazmii mutacji LHON w fibroblastach weszły również w skład pracy licencjackiej Klaudii Karwowskiej pt.: „Analiza poziomu mutacji 11778G>A i 3460G>A w hodowlach komórkowych wyprowadzonych od pacjentów z dziedziczną neuropatią wzrokową Lebera”, a wyniki analizy poziomu heteroplazmii tych mutacji w komórkach cybryd weszły także w skład pracy magisterskiej Agaty Kulickiej pt.: „Hybrydy transmitochondrialne, jako model komórkowy dziedzicznej neuropatii wzrokowej Lebera”. Byłam opiekunem wyżej wymienionych prac.

Dodatkowo na DNA wyizolowanym z krwi pacjenta p.1 przeprowadzono sekwencjonowanie całego genomu mitochondrialnego. Analiza ta umożliwiła wykrycie polimorfizm C7028C, charakterystycznego dla mitochondrialnej haplogrupy H. Nie wykryto polimorfizmów charakterystycznych dla pozostałych haplogrup europejskich, co pozwoliło

zakwalifikować badanych pacjentów z dwiema mutacjami LHON do haplogrupy H (MITOMAP).



**Rysunek 22. Analiza PCR-RFLP mutacji m.11778G>A i m.3460G>A w DNA z komórek krwi (A i B) oraz w linii komórkowej limfoblastów (C i D).** Wyniki trawienia dla mutacji m.11778G>A przedstawiono na rysunkach A i C, natomiast dla mutacji m.3460G>A przedstawiono na rysunkach B i D. m.11778G>A powoduje powstanie miejsca restrykcyjnego dla enzymu *MaeIII* i w wyniku cięcia endonukleazą otrzymuje się prążki długości 146pz i 84pz, natomiast m.3460G>A powoduje zanik miejsca trawienia dla enzymu *HinII* i produkt reakcji nie jest cięty endonukleazą. W przypadku braku tej mutacji powstają dwa prążki długości 183pz i 119pz. p.1 - p.7 - pacjenci z dwiema mutacjami LHON, 1 MUT - zdrowa nosicielka m.11778G>A, + kontrola pozytywna (z mutacją), - kontrola negatywna (bez mutacji).



**Rysunek 23. Analiza PCR-RFLP mutacji m.11778G>A i m.3460G>A w DNA z linii fibroblastów (A i B) oraz cybryd (C i D).** Wyniki trawienia dla mutacji m.11778G>A przedstawiono na rysunkach A i C, natomiast dla mutacji m.3460G>A przedstawiono na rysunkach B i D. m. 11778G>A powoduje powstanie miejsca restrykcyjnego dla enzymu *MaeIII* i w wyniku cięcia endonukleazą otrzymuje się prążki długości 146pz i 84pz, natomiast m.3460G>A powoduje zanik miejsca trawienia dla enzymu *HinII* i produkt reakcji nie jest cięty endonukleazą. W przypadku braku tej mutacji powstają dwa prążki długości 183pz i 119pz. p.1- p.7 - pacjenci z dwiema mutacjami LHON, + kontrola pozytywna (z mutacją), - kontrola negatywna (bez mutacji).

Analiza ilościowa wykonana w programie Multi Gauge V3.0 pozwoliła na określenie poziomu heteroplazmii we wszystkich analizowanych komórkach. Procentowy wynik analizy poziomu heteroplazmii w poszczególnych komórkach/liniach komórkowych przedstawiono w tabelach 20 i 21.

**Tabela 20. Poziom heteroplazmii m.11778G>A w DNA z komórek krwi oraz linii limfoblastów, fibroblastów i cybryd.**

	11778G>A			
	KREW	LIMFOBLASTY	FIBROBLASTY	CYBRYDY
1MUT	-	94,2% ± 0,7	-	-
p. 1	95,5% ± 0,02	95,4% ± 1,1	95,9% ± 0,3	94,0% ± 0,6
p. 3	96,7% ± 0,1	97,7% ± 0,2	97,1% ± 0,4	40,7% ± 0,7
p. 4	98,9% ± 0,2	95,3% ± 1,4	97,9% ± 0,04	45,4% ± 0,8
p. 5	98,0% ± 0,3	97,7% ± 0,2	97,4% ± 0,1	63,7% ± 0,6
p. 6	93,9% ± 0,3	97,9% ± 0,1	97,8% ± 0,1	89,8% ± 1,0
p. 7	96,3% ± 0,3	96,3% ± 0,3	98,3% ± 0,2	34,3% ± 1,1

**Tabela 21. Poziom heteroplazmii m.3460G>A w DNA z komórek krwi oraz linii limfoblastów, fibroblastów i cybryd.**

	3460G>A			
	KREW	LIMFOBLASTY	FIBROBLASTY	CYBRYDY
p.1	7,0% ± 0,6	7,5% ± 1,0	83,3% ± 0,5	3,0% ± 0,4
p.3	17,5% ± 0,6	10,3% ± 1,0	90,3% ± 0,8	89,3% ± 0,6
p.4	6,2% ± 0,1	6,1% ± 0,8	10,5% ± 0,4	7,3% ± 0,2
p.5	3,2% ± 0,4	3,5% ± 0,4	2,7% ± 0,3	5,4% ± 0,6
p.6	14,3% ± 0,3	6,4% ± 0,1	41,0% ± 0,4	36,6% ± 0,6
p.7	3,1% ± 0,4	9,7% ± 0,4	8,4% ± 0,4	12,7% ± 0,9

Analiza wyników poziomu heteroplazmii m.11778G>A i m.3460G>A przeprowadzona na mtDNA z linii komórkowych limfoblastów i fibroblastów oraz z komórek krwi pacjentów z dwiema mutacjami LHON (tabele 20 i 21) wykazała różnice w poziomie m.3460G>A między różnymi typami komórek jak również między różnymi pacjentami w rodzinie, natomiast m.11778G>A utrzymuje się na zbliżonym poziomie u wszystkich pacjentów we

wszystkich typach komórek. W komórkach krwi, linii limfoblastów i fibroblastów poziom heteroplazmii m.11778G>A mieści się w zakresie od  $93,9\% \pm 0,3$  -  $98,9\% \pm 0,2$ . Poziom heteroplazmii m.3460G>A jest bardziej zróżnicowany i zależny od typu analizowanych komórek - w DNA z komórek krwi zakres ten wynosi od  $3,2\% \pm 0,4$  do  $17,5\% \pm 0,6$ , w limfoblastach od  $3,5\% \pm 0,4$  do  $10,3\% \pm 1,0$ , a w fibroblastach od  $2,7\% \pm 0,3$  do  $90,3\% \pm 0,8$ . Najbardziej zróżnicowany poziom m.3460G>A między różnymi typami komórek zaobserwowano dla pacjentów p.1, p.3 oraz p.6 - u wszystkich tych pacjentów najwyższy poziom tej mutacji znajdował się w DNA z linii fibroblastów.

Między komórkami limfoblastów oraz krwi, z której wyprowadzono te linie, nie zauważono różnic w poziomie m.11778G>A, natomiast różnice zauważono dla m.3460G>A. Mutacja ta była na znacząco niższym poziomie w limfoblastach pacjentów p.3 i p.6 ( $t=10,70$ ,  $p=0,01$  i  $t=43,27$ ,  $p=0,0006$  odpowiednio dla p.3 i p.6) oraz znacznie wyższym w limfoblastach pacjenta p.7 ( $t=14,29$ ,  $p=0,005$ ). Oznacza to, że w czasie procedury wyprowadzania linii limfoblastów doszło do selekcji przeciwko m.3460G>A w dwóch liniach, natomiast w jednej linii selekcja pozytywna skutkowała zwiększeniem poziomu tej mutacji w limfoblastach. W pozostałych liniach limfoblastów m.3460G>A była na porównywalnym poziomie jak w komórkach krwi. Natomiast porównując poziomy heteroplazmii obu mutacji we krwi i fibroblastach można zauważyć, że nie ma różnic między tymi dwoma typami komórek w poziomie m.11778G>A, natomiast u wszystkich męskich probandów w komórkach fibroblastów jest istotny statystycznie ( $p<0,05$ ) wyższy poziom m.3460G>A. Tylko u zdrowej nosicielki nie widać różnic w poziomie m.3460G>A między komórkami krwi i fibroblastów ( $t=1,73$ ,  $p=0,33$ ).

Osobno należy analizować linię komórkową cybryd jako linię nie wyodrębnioną bezpośrednio z tkanek pacjentów, a skonstruowaną w celu analizy wpływu mutacji mitochondrialnych na fizjologię komórek przy tym samym tle jądrowym komórek rho0 143B. Poziomy heteroplazmii obu mutacji w liniach cybryd są bardzo zróżnicowane. Jednak można zauważyć, że poziom obu mutacji w liniach komórkowych cybryd jest w większości przypadków niższy w porównaniu z poziomem ustalonym w fibroblastach, z których je skonstruowano, co sugeruje, że w czasie procesu cybrydyzacji doszło do selekcji negatywnej obu mutacji. Poziom heteroplazmii m.3460G>A istotnie statystycznie obniżył się w liniach cybryd p.1, p.5, p.6, a wzrósł w linii p.7. Natomiast poziom heteroplazmii m.11778G>A istotnie statystycznie obniżył się we wszystkich liniach oprócz linii p.1.



#### 4.4 Analiza zmienności poziomu heteroplazmii m.11778G>A oraz m.3460G>A we krwi w czasie

W 2008 roku dr hab. Katarzyna Tońska w ramach badań diagnostycznych polskiej rodziny z dwiema mutacjami LHON dokonała oceny poziomu heteroplazmii obu mutacji we krwi 6 pacjentów. W 2012 roku w ramach wykonywania niniejszej pracy doktorskiej ponownie otrzymano próbki krwi od 6 pacjentów, w tym od czterech, którzy byli analizowani w 2008 roku. W celu oceny, czy poziom heteroplazmii obu mutacji we krwi zmienia się w czasie, przeprowadzono ponowną analizę tego parametru u tych samych pacjentów, którzy byli analizowani cztery lata wcześniej. Otrzymane w 2012 roku wyniki analizy poziomu heteroplazmii m.11778G>A oraz m.3460G>A w limfocytach oraz ich porównanie z danymi z 2008 roku przedstawiono w tabeli 22.

**Tabela 22. Analiza porównawcza poziomu heteroplazmii m.11778G>A i m.3460G>A określonej w DNA z krwi pacjentów z rodziny z dwiema mutacjami LHON.** Analizy dotyczą próbek krwi pobranych w 2008 roku i 2012 roku. Dane z 2008 roku pochodzą z analiz genetycznych przeprowadzonych przez dr hab. Katarzynę Tońską (Tońska i wsp., 2008).

pacjent	m.11778G>A		m.3460G>A	
	2008 rok	2012 rok	2008 rok	2012 rok
p.1	93% $\pm$ 0,9	95,5% $\pm$ 0,02	9,6% $\pm$ 0,1	7,0% $\pm$ 0,6
p.5	96,3% $\pm$ 1,2	98,0% $\pm$ 0,3	0,6% $\pm$ 0,3	3,2% $\pm$ 0,4
p.6	93,0% $\pm$ 2,1	93,9% $\pm$ 0,3	21,3% $\pm$ 0,4	14,3% $\pm$ 0,3
p.7	93,7% $\pm$ 1,9	96,3% $\pm$ 0,3	7,2% $\pm$ 1,0	3,1% $\pm$ 0,4

W celu oceny czy w odstępie czterech lat zmienił się w istotny sposób poziom heteroplazmii obu mutacji we krwi wykonano test t Studenta. Wyniki analizy statystycznej przedstawiono w tabeli 23.



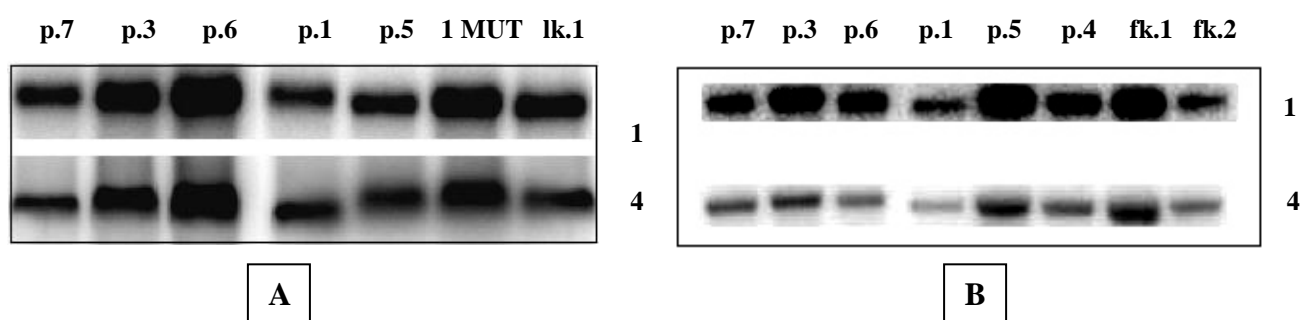
**Tabela 23.** Wynik analizy testu t Studenta do oceny istotności różnic w poziomie heteroplazmii mutacji m.11778G>A i m.3460G>A określonych w 2008 roku i 2012 roku. Wartość  $p < 0,05$  oznacza, że różnica jest istotna statystycznie.

pacjent	m.11778G>A	m.3460G>A
p.1	t=0,64, p=0,53	t=1,91, p=0,08
p.5	t=0,60, p=0,56	t=0,54, p=0,60
p.6	t=0,05, p=0,96	t=1,19, p=0,26
p.7	t=0,02, p=0,99	t=0,69, p=0,51

Analiza statystyczna poziomów heteroplazmii obu mutacji u wszystkich badanych wykazała, że nie ma istotnych statystycznie różnic między wynikami otrzymanymi w 2008 i 2012 roku ( $p > 0,05$ ; tabela 23). Uzyskane wyniki wskazują, że poziom mutacji m.11778G>A i m.3460G>A we krwi badanych pacjentów z LHON w przeciągu czterech lat nie zmienił się w istotnym stopniu.

#### **4.5 Analiza poziomów transkryptów z genów mitochondrialnych *ND1* i *ND4* w liniach komórkowych z mutacjami LHON**

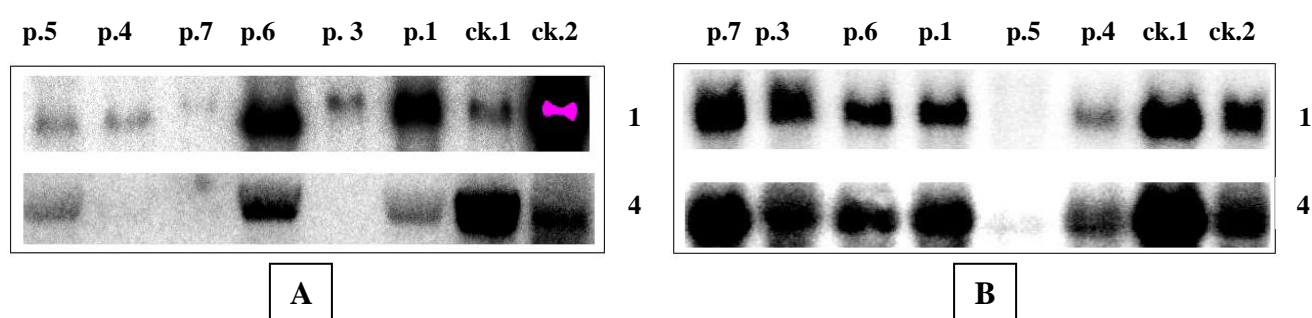
W celu określenia czy w badanych liniach komórkowych pacjentów z mutacjami m.11778G>A w genie *ND4* oraz m.3460G>A w genie *ND1* dochodzi do transkrypcji z tych genów i czy obecność którejś z mutacji wpływa na zaburzenie w proporcji transkryptów z obu genów względem siebie przeprowadzono eksperyment typu northern blot. Z wykorzystaniem znakowanych izotopowo sond oligonukleotydowych określono poziom transkryptów obu genów na RNA wyizolowanym z komórek po 10 pasażu, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i metody. Wyniki analizy poziomów transkryptów z genów *ND1* i *ND4* dla pacjentów z dwiema mutacjami LHON oraz jednej zdrowej nosicielki m.11778G>A i zdrowych kontroli bez mutacji w genomie mitochondrialnym określone w liniach komórkowych limfoblastów i fibroblastów przedstawiono na rysunku 24.



**Rysunek 24. Analiza poziomu transkryptów genów *NDI* i *ND4* w liniach komórkowych limfoblastów (A) i fibroblastów (B).** p.1 - p.7 - linie komórkowe pacjentów z dwiema mutacjami LHON (m.11778G>A i m.3460G>A), 1 MUT - zdrowa nosicielka mutacji m.11778G>A, lk.1, fk.1, fk.2 – zdrowe kontrole bez mutacji, 1- transkrypty genu mitochondrialnego *NDI*, 4- transkrypty genu mitochondrialnego *ND4*.

Przeprowadzona analiza na liniach limfoblastów i fibroblastów wykazała obecność transkryptów z genów *NDI* i *ND4* we wszystkich badanych liniach, zarówno kontrolnych jak i z mutacjami m.11778G>A i m.3460G>A. Poziomy transkryptów z genu *NDI* w stosunku do *ND4* we wszystkich liniach były porównywalne, bez względu na poziom heteroplazmii obu mutacji.

W 10 pasażu w liniach cybryd p.3, p.4 i p.7 nie wykryto transkryptów dla genu *ND4* (rysunek 25A), dlatego postanowiono pohodować komórki przez kolejne 5 pasaży, ponownie wyizolować RNA i określić poziomy transkryptów z obu genów. Wyniki analizy poziomu transkryptów dla komórek cybryd w 10 i 15 pasażu przedstawiono na rysunku 25.

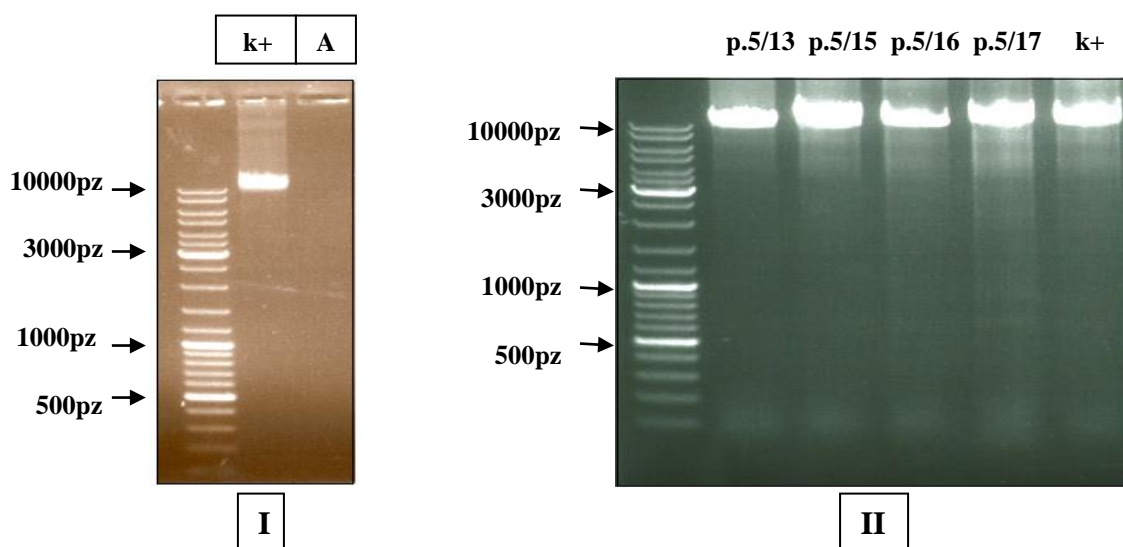


**Rysunek 25. Analiza poziomu transkryptów genów *NDI* i *ND4* w linii komórkowej cybryd po 10 (A) i 15 (B) pasażu.** p.1 - p.7 – linie komórkowe cybryd z dwiema mutacjami LHON (m.11778G>A i m.3460G>A), ck.1 i ck.2 – zdrowe kontrole bez mutacji, 1 - transkrypty genu mitochondrialnego *NDI*, 4 - transkrypty genu mitochondrialnego *ND4*.

W pasażu 15 tylko w komórkach cybryd linii p.5 nie wykazano obecności transkryptów z genów *NDI* i *ND4*, w pozostałych liniach cybryd transkrypty były obecne, a poziomy

transkryptów z genu *ND1* były równe poziomom transkryptów z genu *ND4*. Nie zauważono korelacji między wyższym poziomem którejś z mutacji, a zmienionym poziomem transkryptów jednego badanego genu względem drugiego.

W celu zbadania przyczyn braku detekcji transkryptów z obu genów mitochondrialnych w linii komórkowej cybryd p.5 w 15 pasażu, z komórek tych wyizolowano całkowity DNA i ponownie zbadano obecność mitochondrialnego DNA w tych komórkach z wykorzystaniem metody długiego PCR (*long PCR*). Analiza *long PCR* dała wynik negatywny, co świadczy o tym, że w linii cybryd p.5 w 15 pasażu nie wykryto tą metodą obecności mtDNA. Uzyskany wynik skłonił ku temu, aby rozbankować inne pasaże komórek cybryd dla pacjenta p.5 i sprawdzić czy również będzie problem z wykryciem mtDNA. Wyniki analizy *long PCR* dla linii komórkowej p.5 w 15 pasażu oraz na DNA z rozbankowanych komórek z różnych pasaży cybryd linii p.5 przedstawiono na rysunku 26.



**Rysunek 26.** Wynik analizy *long PCR* dla DNA z cybryd linii p.5 z pasażu 15 (IA) oraz dla DNA z cybryd pacjenta p.5 z różnych pasaży (II). Produkt reakcji migruje na wysokości 9815pz. p.5/13 - p.5/17 – oznaczają kolejne pasaże linii p.5, k+ - kontrolne DNA wyizolowane z krwi.

Analiza *long PCR* na innych pasażach komórek cybryd linii p.5 wykazała obecność mtDNA we wszystkich badanych liniach. Brak obecności mtDNA w linii p.5 w 15 pasażu tłumaczy ujemny wynik reakcji northern blot i sugeruje wystąpienie jakiegoś zaburzenia podczas hodowli tych komórek. Po potwierdzeniu obecności mtDNA w pozostałych pasażach cybryd linii p.5, wykorzystywano je do kolejnych eksperymentów.

## 4.6 Analiza produkcji wolnych rodników tlenowych

Jedną z najczęściej przytaczanych hipotez dotyczących wpływu mutacji LHON na metabolizm komórkowy jest, że powodują one wzmożony stres oksydacyjny. W celu zbadania stresu oksydacyjnego w komórkach z dwiema mutacjami LHON w stosunku do zdrowych kontroli wykonano analizy mikroskopowe produkcji reaktywnych form tlenu w komórkach fibroblastów i cybryd. Analizy wykonano z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego, a stres oksydacyjny wzbudzano poprzez 24-godzinną hodowlę komórek z 2,5µM rotenonem. Do analizy wykorzystano zestaw ROS/RNS Detection Kit (Enzo Life Sciences) pozwalający na mikroskopową detekcję produkcji reaktywnych form tlenu i azotu. Zastosowany zestaw nie był testem ilościowym, ale pozwalał uwidocznić intensywność stresu oksydacyjnego w komórkach.

Badanie przeprowadzono w trzech wariantach:

- komórki nietraktowane rotenonem (pożywka) (analiza autofluorescencji)
- komórki nietraktowane rotenonem + odczynnik ROS/RNS
- komórki traktowane 2,5µM rotenonem/24godziny + odczynnik ROS/RNS

Analizę przeprowadzono na 6 liniach komórkowych fibroblastów i 6 liniach cybryd z mutacjami m.11778G>A i m.3460G>A oraz odpowiednio czterech liniach kontrolnych fibroblastów i dwóch liniach kontrolnych cybryd. Wyniki analizy mikroskopowej stresu oksydacyjnego w analizowanych liniach komórkowych przedstawiono na rysunkach 27-31. Zdjęcia mikroskopowe wykonano przy pomocy obiektywu 20x i filtrów zgodnych z barwnikami fluoresceiną (dla ROS) i Texas Red (dla  $o_2^-$ ) przy czasie naświetlania 2000ms. Zdjęcia mikroskopowe wykonane zostały we współpracy z Klaudią Karwowską w ramach jej pracy magisterskiej pt.: „Odpowiedź komórkowa na stres oksydacyjny w dziedzicznej neuropatii wzrokowej Lebera”, której byłam opiekunem.

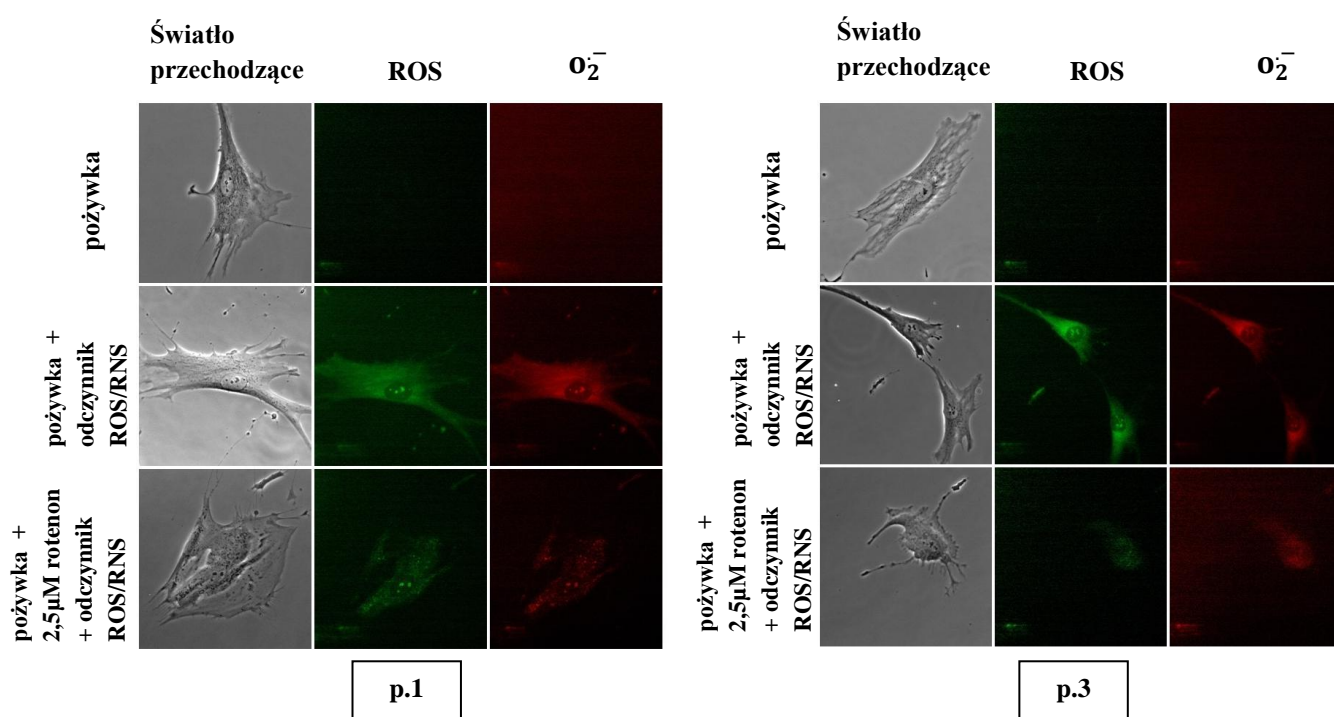
### Linie komórkowe fibroblastów

Analizy produkcji reaktywnych form tlenu przeprowadzone na liniach komórkowych fibroblastów wskazują, że wszystkie komórki fibroblastów hodowane w samej pożywce wykazywały minimalny poziom autofluorescencji (rysunki 27, 28 i 29). Fibroblasty zarówno pacjentów jak i osób z grupy kontrolnej po dodaniu odczynnika barwiącego ROS/RNS wykazują wysoki poziom fluorescencji obejmujący obszar całej komórki, przy czym poziom

fluorescencji odzwierciedlający poziom wszystkich reaktywnych form tlenu (ROS) i anionu ponadtlenkowego jest wyższy u pacjentów z mutacjami LHON (rysunki 27 i 28) niż w liniach kontrolnych (rysunek 29).

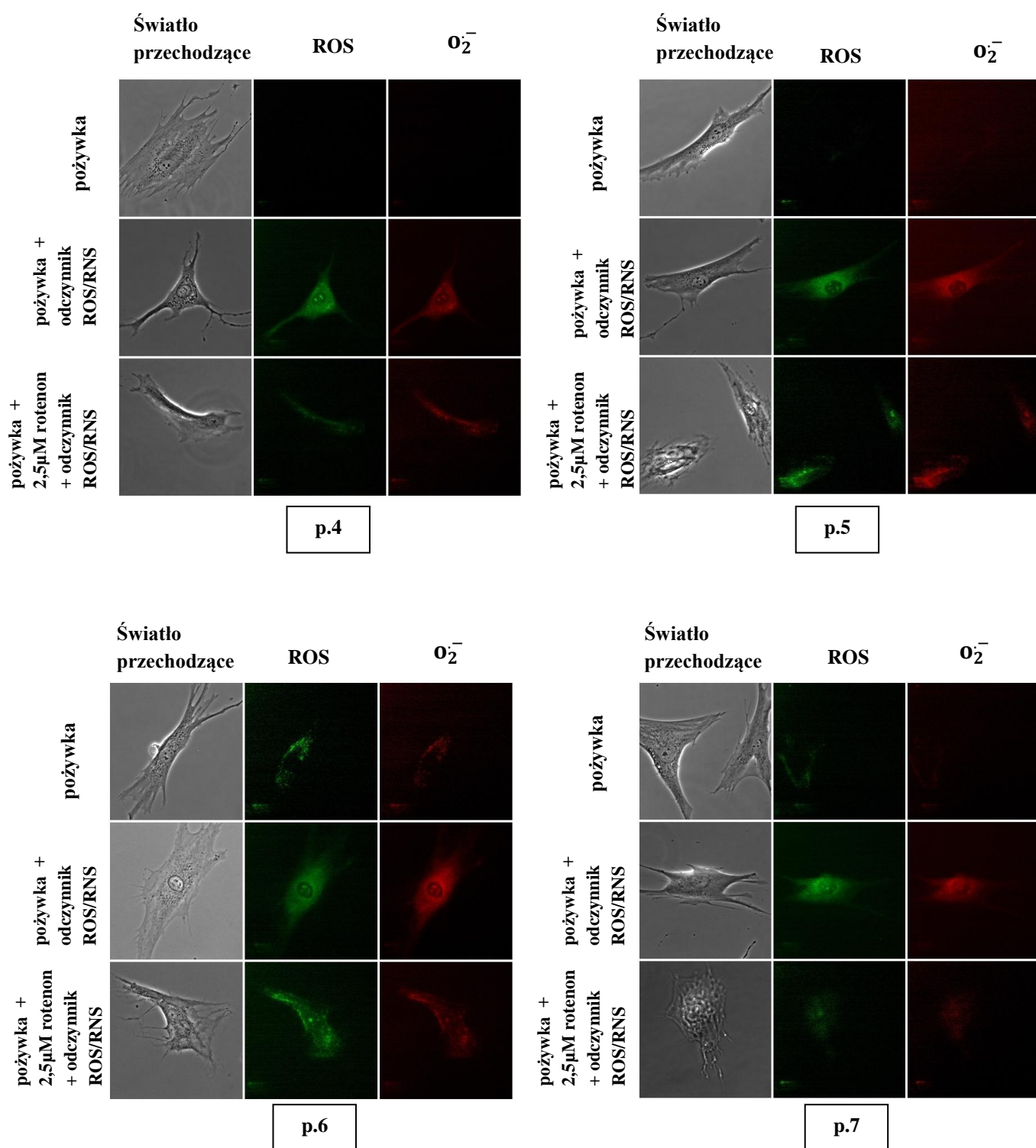
Analiza wszystkich reaktywnych form tlenu (ROS) i samego rodnika ponadtlenkowego wykazały, że właśnie rodnik ponadtlenkowy jest dominującą reaktywną formą tlenu we wszystkich badanych liniach fibroblastów.

24-godzinna inkubacja z 2,5μM rotenonem skutkowała lekkim spadkiem poziomu fluorescencji u pacjentów, z widoczną w świetle przechodzącym zmianą morfologii komórek, szczególnie w komórkach pacjentów p.5 i p.7. Natomiast wzbudzenie stresu oksydacyjnego poprzez hodowlę z rotenonem całkowicie zredukowało fluorescencję komórek z linii kontrolnych (rysunek 29), a ponadto w świetle przechodzącym zaobserwowano jedynie szczątkowe fragmenty komórek, których morfologia znacząco odbiegała od tej w przypadku hodowli bez rotenonu.

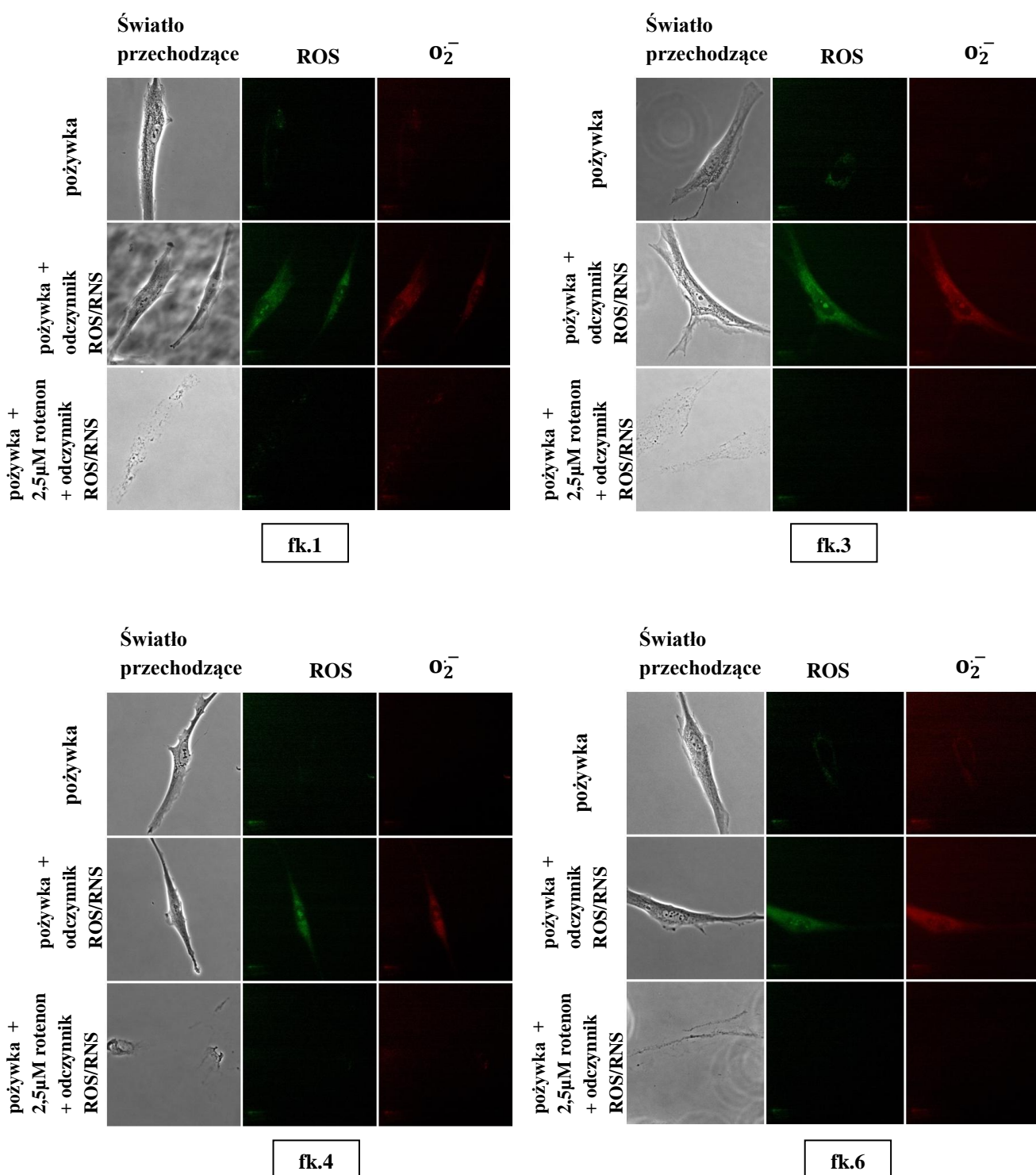


**Rysunek 27.** Zestawienie zdjęć mikroskopowych analizy stresu oksydacyjnego w komórkach fibroblastów w trzech warunkach detekcji (pożywka, żywka + odczynnik ROS/RNS, żywka + 2,5μM rotenon + odczynnik ROS/RNS) dla następujących pacjentów z mutacjami LHON: p.1 i p.3. Obrazki przedstawiają produkcję wszystkich reaktywnych form tlenu (ROS) oraz rodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\bullet -}$ ) w trzech warunkach detekcji.





Rysunek 28. Zestawienie zdjęć mikroskopowych analizy stresu oksydacyjnego w komórkach fibroblastów w trzech warunkach detekcji (pożywka, żywka + odczynnik ROS/RNS, żywka + 2,5μM rotenon + odczynnik ROS/RNS) dla następujących pacjentów z mutacjami LHON: p.4, p.5, p.6 i p.7. Obrazki przedstawiają produkcję wszystkich reaktywnych form tlenu (ROS) oraz rodnika ponadtlenkowego ( $O_2^-$ ) w trzech warunkach detekcji.



Rysunek 29. Zestawienie zdjęć mikroskopowych analizy stresu oksydacyjnego w komórkach fibroblastów w trzech warunkach detekcji (pożywka, żywka + odczynnik ROS/RNS, żywka + 2,5μM rotenon + odczynnik ROS/RNS) dla osób z grupy kontrolnej: fk.1, fk.3, fk.4 i fk.6. Obrazki przedstawiają produkcję wszystkich reaktywnych form tlenu (ROS) oraz rodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\bullet -}$ ) w trzech warunkach detekcji.

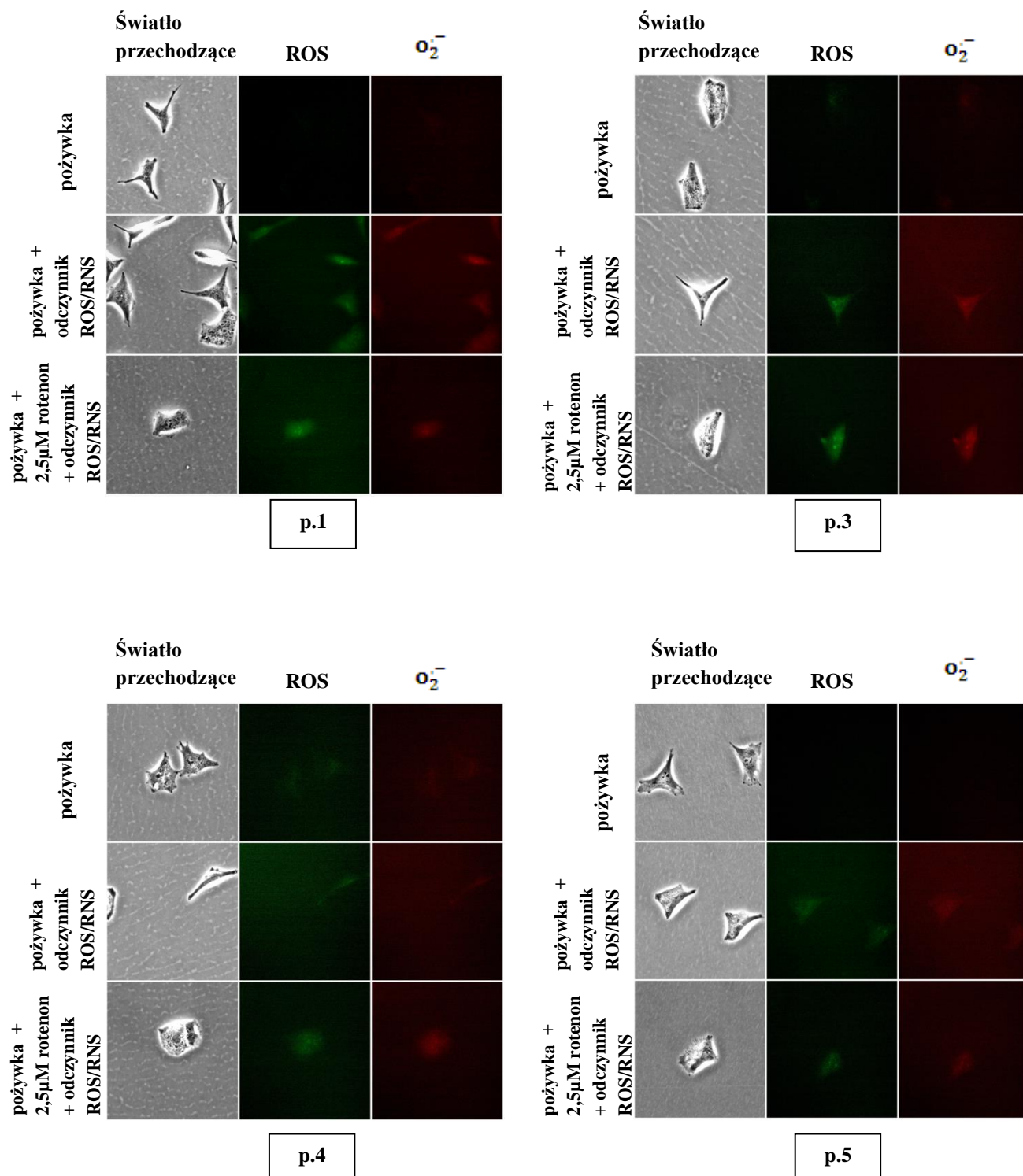
### **Linie komórkowe cybryd**

Komórki cybryd podobnie jak komórki fibroblastów wykazują znikomą autofluorescencję. Poziom fluorescencji odzwierciedlający stres oksydacyjny w cybrydach z mutacjami LHON jest wysoki i porównywalny między warunkami hodowli przed i po dodaniu rotenonu (rysunki 30 i 31). Najwyższy poziom stresu oksydacyjnego zaobserwowano w liniach komórkowych cybryd z wysokim poziomem obu mutacji m.11778G>A/m.3460G>A odpowiednio 94%/3%, 41%/89% i 90%/37% dla linii p.1, p.3 i p.6 (rysunki 30 i 31). Poziom stresu oksydacyjnego w tych liniach jest podobny przed i po dodaniu rotenonu. Jedynie w liniach cybryd z mutacjami m.11778G>A/m.3460G>A utrzymującymi się na poziomie odpowiednio 45%/7% dla p.4 i 34%/13% dla p.7 poziom fluorescencji podstawowej (w zwykłej pożywce z dodatkiem odczynnika barwiącego umożliwiającego monitoring produkcji wolnych rodników) jest niższy w porównaniu do pozostałych linii cybryd z mutacjami LHON, a fluorescencja wyraźnie wzrasta w warunkach hodowli z rotenonem (rysunki 30 i 31).

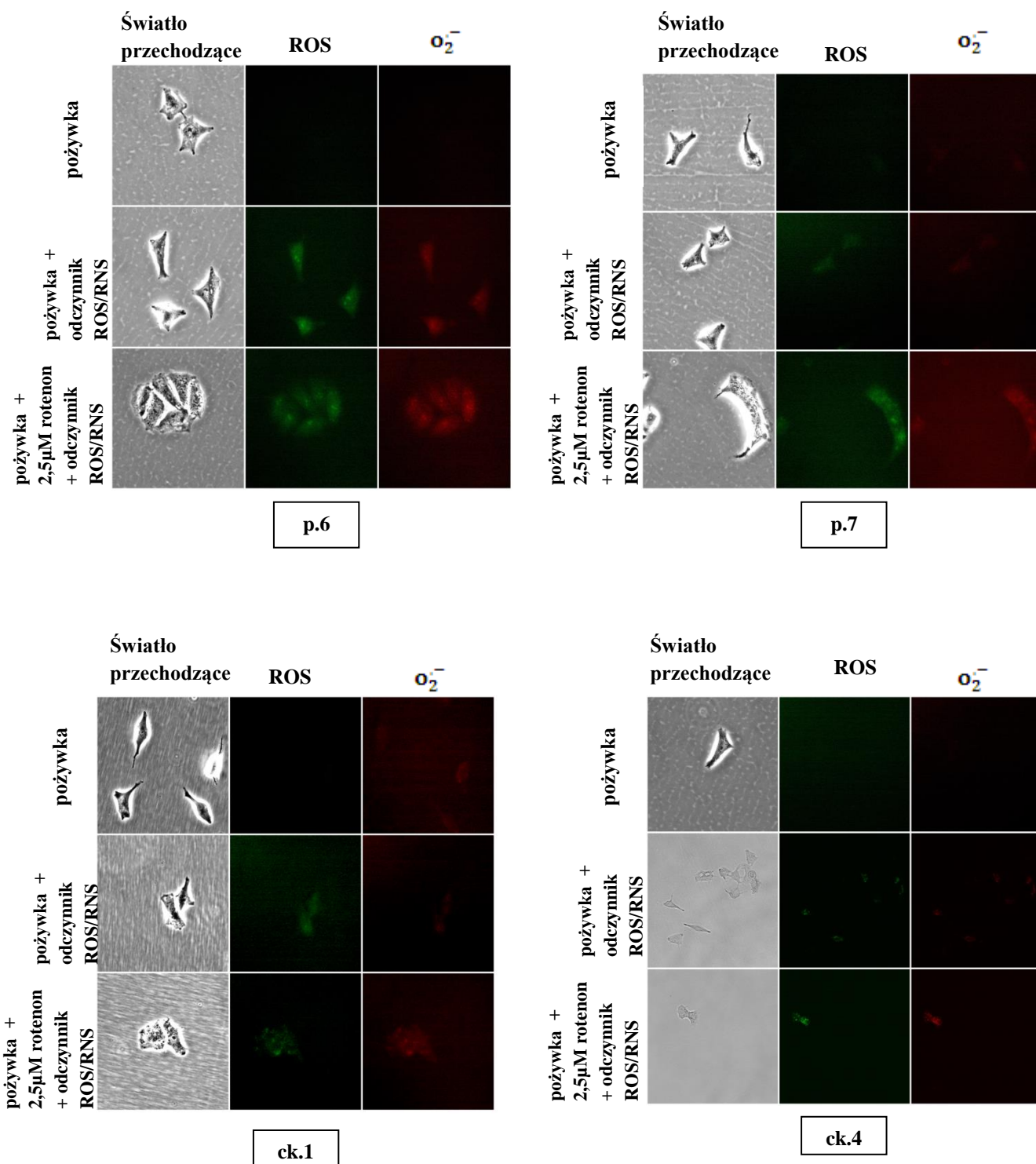
Poziom stresu oksydacyjnego w cybrydach kontrolnych w warunkach hodowli bez rotenonu jest niski, natomiast po indukcji stresu oksydacyjnego rotenonem, w komórkach cybryd kontrolnych wzrasta ilość ROS i  $o_2^-$  tak jak miało to miejsce w przypadku linii komórkowych p.4 i p.7 z mutacjami LHON (rysunek 31). Ponadto w przeciwieństwie do fibroblastów osób z grupy kontrolnej, komórki cybryd osób z grupy kontrolnej przeżywają warunki hodowli z rotenonem i wykazują wysoki poziom stresu oksydacyjnego (rysunki 29 i 31).

Podobnie jak to zaobserwowano w komórkach fibroblastów, tak i w komórkach cybryd dominującą formą reaktywnych form tlenu jest rodnik ponadtlenkowy.



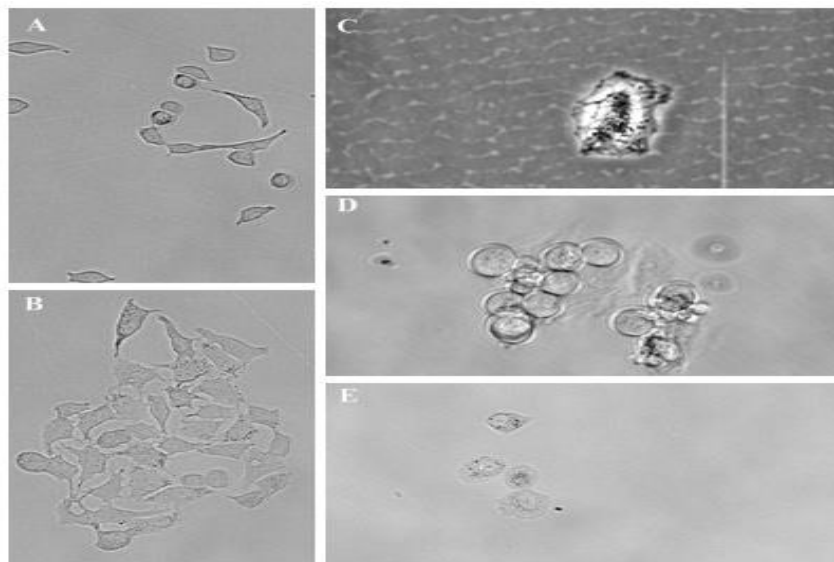


Rysunek 30. Zestawienie zdjęć mikroskopowych analizy stresu oksydacyjnego w komórkach cybryd w trzech warunkach detekcji (pożywka, żywka + odczynnik ROS/RNS, żywka + 2,5μM rotenon + odczynnik ROS/RNS) dla następujących linii z mutacjami LHON: p.1, p.3, p.4 i p.5. Obrazki przedstawiają produkcję wszystkich reaktywnych form tlenu (ROS) oraz rodnika ponadtlenkowego  $O_2^{\bullet -}$  w trzech warunkach detekcji.



**Rysunek 31.** Zestawienie zdjęć mikroskopowych analizy stresu oksydacyjnego w komórkach cybryd w trzech warunkach detekcji (pożywka, żywka + odczynnik ROS/RNS, żywka + 2,5μM rotenon + odczynnik ROS/RNS) dla następujących linii z mutacjami LHON: p.6 i p.7 i osób z grupy kontrolnej: ck.1 i ck.4. Obrazki przedstawiają produkcję wszystkich reaktywnych form tlenu (ROS) oraz rodnika ponadtlennkowego  $O_2^{\bullet-}$  w trzech warunkach detekcji.

Analizy zdjęć mikroskopowych komórek cybryd w świetle przechodzącym przed dodaniem rotenonu i po dodaniu tego odczynnika wykazały, że niektóre komórki linii cybryd kontrolnych i komórek z mutacjami LHON linii p.4 i p.7 w hodowli z inhibitorem kompleksu I wykazują znaczne zmiany morfologii. Zestawienie przykładowych zdjęć komórek przed i po indukcji stresu oksydacyjnego rotenonem wykonanych w świetle przechodzącym przedstawiono na rysunku 32.



**Rysunek 32. Analiza morfologii komórek cybryd przed (A i B) i po indukcji stresu oksydacyjnego rotenonem (C, D i E).** Hodowla z rotenonem spowodowała wyraźne zmiany morfologiczne komórek, takie jak pęcznienie, zwiększenie swoich rozmiarów.

Analiza zdjęć mikroskopowych w świetle przechodzącym komórek przed i po dodaniu rotenonu wskazuje, że zaobserwowane zmiany morfologiczne, takie jak pęcznienie komórek i zwiększanie ich rozmiarów są cechami charakterystycznymi zachodzącej nekrozy. Taki wynik sugeruje, że w niektórych komórkach kontrolnych i o niskim poziomie mutacji LHON hodowla z rotenonem spowodowała ich nekrotyczną śmierć.

#### 4.7 Analiza oddychania komórkowego

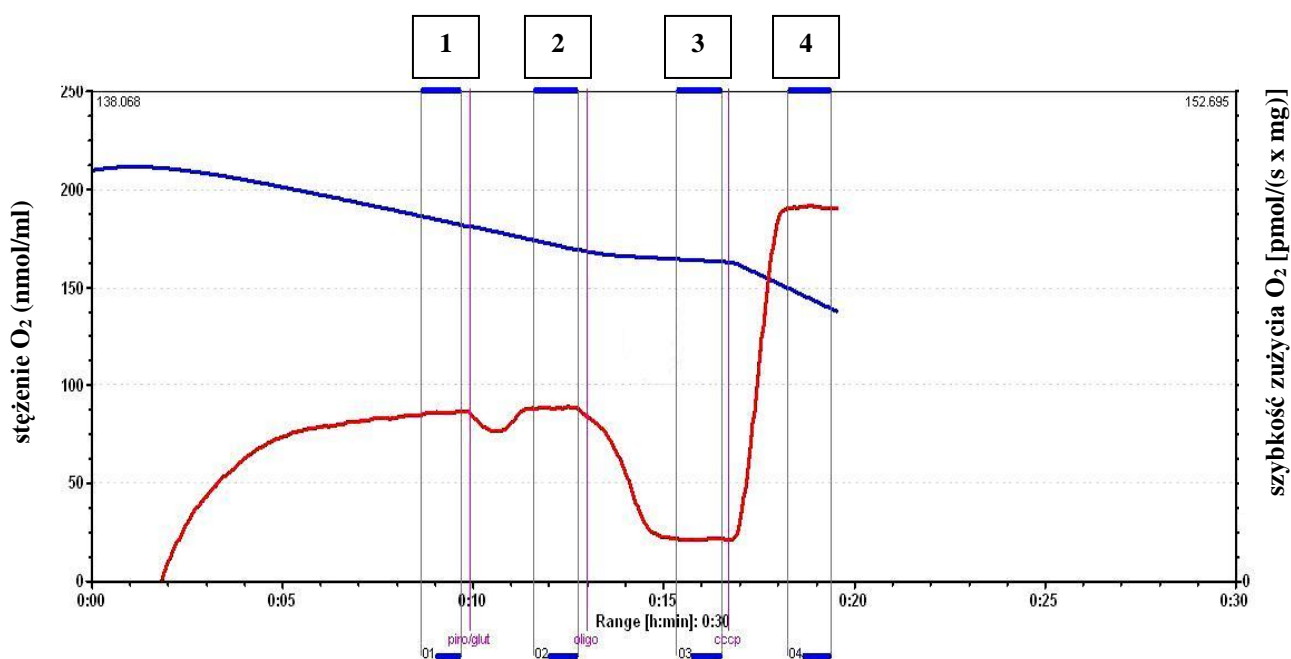
Mutacje m.11778G>A oraz m.3460G>A występujące w mtDNA pacjentów z LHON lokują się w genach kodujących białka kompleksu I łańcucha oddechowego, odpowiednio *ND4* i *ND1*, dlatego sugeruje się, że mutacje w genach kodujących te białka mogą powodować poważne zaburzenia aktywności tego kompleksu i obniżenie poziomu oddychania komórkowego. Dlatego w ramach niniejszej pracy przeprowadzono analizę oddychania komórkowego w wybranych komórkach limfoblastów, fibroblastów i cybryd

pacjentów z dwiema mutacjami LHON oraz osób z grupy kontrolnej oraz limfoblastów zdrowej nosicielki mutacji m.11778G>A. Pomiary oddychania komórkowego dzięki uprzejmości prof. dr hab. Krzysztofa Zabłockiego wykonano na oksygrafie (Oxygraph-2k Oroboros) w Pracowni Metabolizmu Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marceliego Nenckiego. Pomiary oddychania mierzonego szybkością zużycia tlenu dokonywano na czterech następujących etapach:

1. szybkość podstawowego zużycia tlenu (przed dodaniem substratów)
2. szybkość zużycia tlenu po dodaniu substratów oddechowych (pirogonian + glutaminian)
3. szybkość zużycia tlenu po dodaniu inhibitora syntazy ATP (oligomycyna)
4. szybkość zużycia tlenu po dodaniu rozpręgacza fosforylacji oksydacyjnej (cccp)

Dla każdej linii komórkowej wykonano cztery niezależne pomiary, a otrzymane wyniki podano w jednostkach  $\frac{pmol}{s \cdot mg}$  (ilość zużytego tlenu w pmol na sekundę na mg białka).

Przykładowy obraz przeprowadzanej analizy przedstawiono na rysunku 33.



**Rysunek 33.** Przykładowy obraz analizy szybkości zużycia tlenu wykonanej z użyciem oksygrafu (Oxygraph-2k Oroboros) dla komórek cybryd linii ck.1. Pomiary wykonano na czterech etapach: 1- warunki podstawowe, 2 - po dodaniu substratów oddechowych: pirogonian + glutaminian, 3 - po dodaniu inhibitora syntazy ATP - oligomycyny, 4 - po dodaniu rozpręgacza fosforylacji oksydacyjnej - cccp. Niebieska linia - stężenie tlenu, czerwona linia – szybkość zużycia tlenu.

Otrzymane wyniki pomiarów uśredniono i przedstawiono na wykresach 1, 3 i 5.

Postanowiono również obliczyć dla poszczególnych linii komórkowych wydolność oddechową (energetyczną) badanych komórek. Wydolność oddechową obliczano poprzez podzielenie szybkości zużycia tlenu przy maksymalnym rozprężeniu mitochondriów (po dodaniu cccp) przez szybkość zużycia tlenu podczas zahamowania pracy syntazy ATP oligomycyną (iloraz szybkości oddychania przy maksymalnym rozprężeniu mitochondriów przez szybkość oddychania przy maksymalnej inhibicji syntazy ATP):

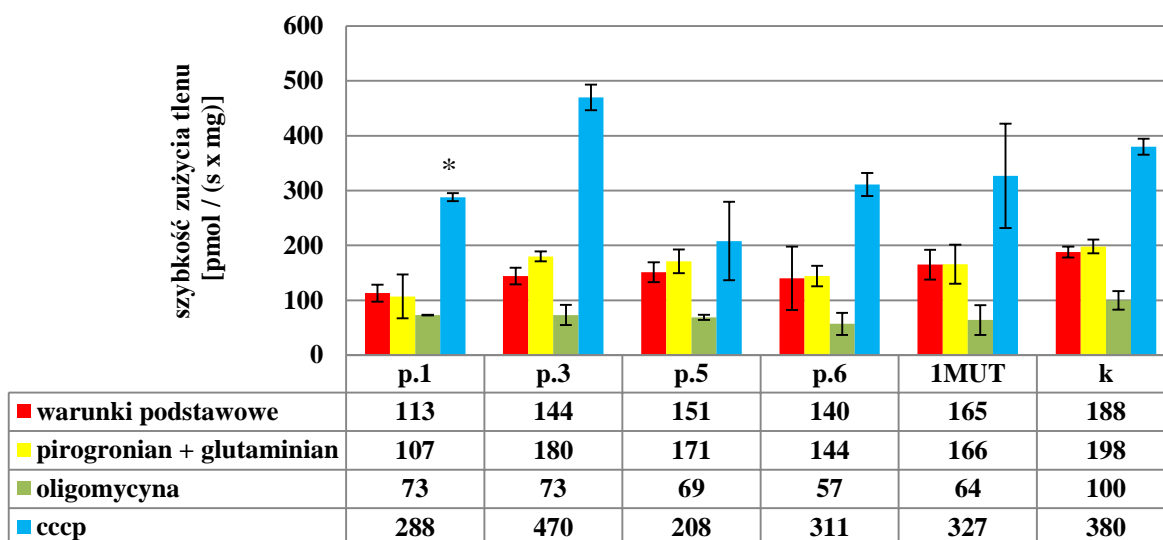
$$\text{wydolność oddechowa} = \frac{\text{cccp}}{\text{oligomycyna}}$$

Otrzymane wyniki przestawiono na wykresach 2, 4 i 6. Istotność różnic między wynikami otrzymanymi dla komórek z mutacjami LHON i komórkami kontrolnymi oceniono testem t Studenta. Wyniki analizy statystycznej przedstawiono w suplemencie 3.

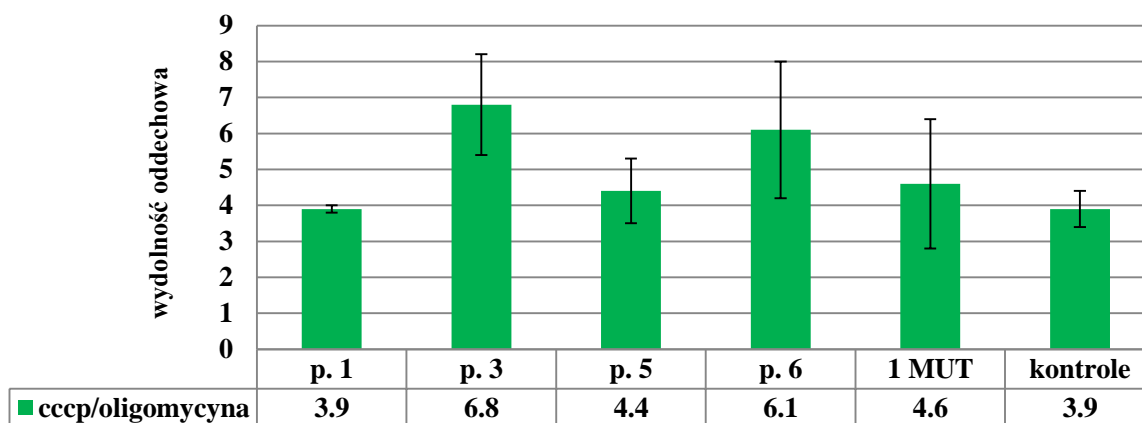
### **Linie komórkowe limfoblastów**

Analizy oddychania komórkowego mierzonego szybkością zużycia tlenu w liniach komórkowych limfoblastów wykazały, że poza linią p.1 w warunkach rozprężenia fosforylacji oksydacyjnej, nie ma różnic w poziomie oddychania komórkowego między komórkami z mutacjami LHON a komórkami kontrolnymi. Ponadto nie zauważono różnic w szybkości oddychania w warunkach podstawowych między komórkami z jedną mutacją i dwiema mutacjami LHON. Wyniki analizy oddychania komórkowego limfoblastów przedstawiono na wykresie 1.

Analiza wydolności oddechowej komórek wykazała, że w liniach limfoblastów z mutacjami LHON wydolność oddechowa była porównywalna z tą określoną dla komórek kontrolnych. Wyniki analizy wydolności oddechowej przedstawiono na wykresie 2.



**Wykres 1. Szybkość oddychania linii komórkowych limfoblastów.** Szybkość oddychania przedstawiono jako szybkości zużycia tlenu w warunkach podstawowych i po dodaniu kolejnych odczynników (pirogronian+glutaminian, oligomycyna, ccep). Podano wyniki uśrednione dla czterech powtórzeń. p.1, p.3, p.5, p.6 - linie limfoblastów pacjentów z dwiema mutacjami LHON, 1MUT - zdrowa nosicielka mutacji m.11778G>A, k - komórki kontrolne. Gwiazdkami oznaczono wyniki istotne statystycznie (\* dla  $p<0,05$ ).



**Wykres 2. Wydolność oddechowa komórek liniach limfoblastów.** Podano wyniki uśrednione dla czterech powtórzeń. p.1, p.3, p.5, p.6 - linie limfoblastów pacjentów z dwiema mutacjami LHON, 1MUT - zdrowa nosicielka mutacji m.11778G>A. Gwiazdkami oznaczono wyniki istotne statystycznie (\* dla  $p<0,05$ ).

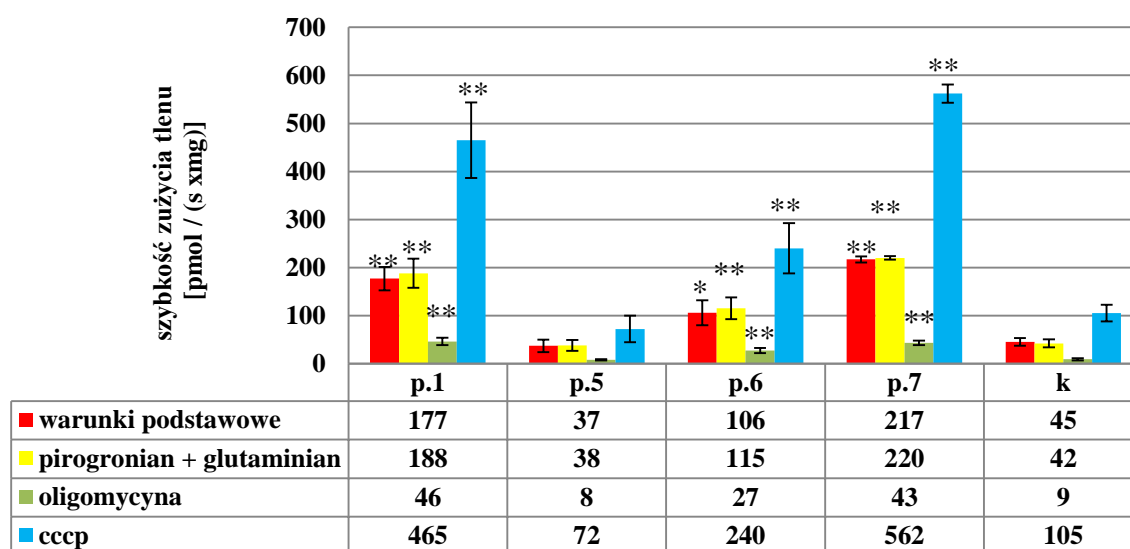
### Linie komórkowe fibroblastów

We wszystkich męskich komórkach fibroblastów z mutacjami LHON (p.1, p.6, p.7) zauważono istotny statystycznie wzrost szybkości oddychania komórek w stosunku do komórek kontrolnych we wszystkich warunkach pomiaru. Natomiast poziom oddychania linii żeńskich fibroblastów (p.5) nie różnił się od tego określonego dla komórek kontrolnych.

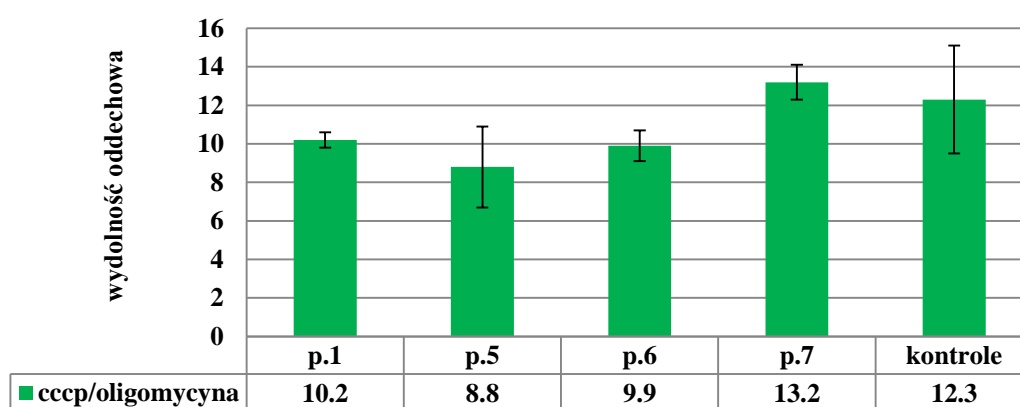


Wyniki analizy oddychania komórkowego fibroblastów przedstawiono na wykresie 3.

Podobnie jak dla komórek linii limfoblastów tak i dla fibroblastów z mutacjami LHON nie zaobserwowano zwiększenia wydolności oddechowej w porównaniu do komórek kontrolnych. Wyniki analizy wydolności oddechowej przedstawiono na wykresie 4.



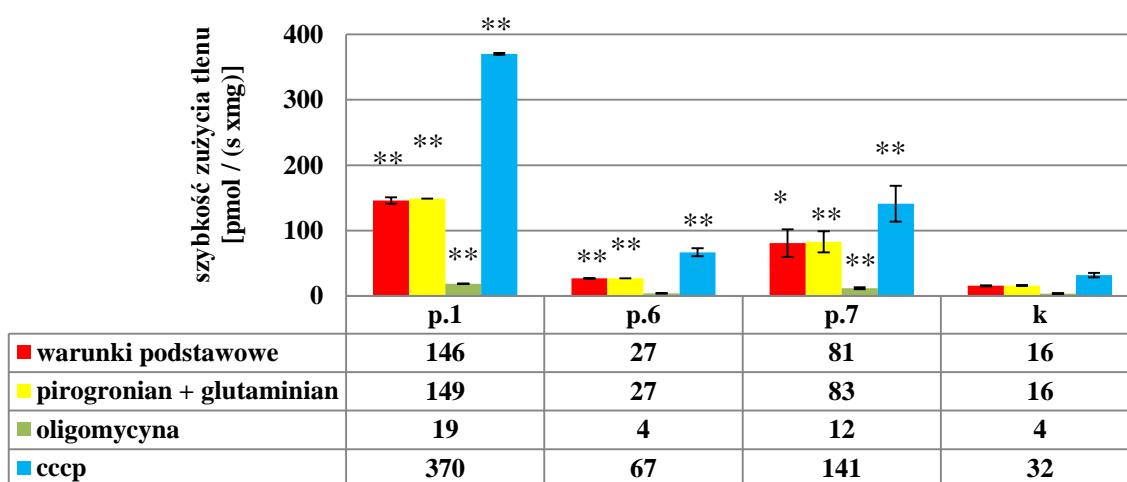
**Wykres 3. Szybkość oddychania w linii komórkowej fibroblastów.** Szybkość oddychania przedstawiono jako szybkości zużycia tlenu w warunkach podstawowych i po dodaniu kolejnych odczynników (pirogronian + glutaminian, oligomycyna, cccp). Podano wyniki uśrednione dla czterech powtórzeń. p.1, p.5, p.6, p.7 - linie fibroblastów pacjentów z dwiema mutacjami LHON, k - komórki kontrolne. Gwiazdkami oznaczono wyniki istotne statystycznie (\* dla  $p < 0,05$ , \*\* dla  $p < 0,01$ ).



**Wykres 4. Wydolność oddechowa komórek linii fibroblastów.** Podano wyniki uśrednione dla czterech powtórzeń. p.1, p.5, p.6, p.7 - linie fibroblastów pacjentów z dwiema mutacjami LHON.

**Linie komórkowe cybryd**

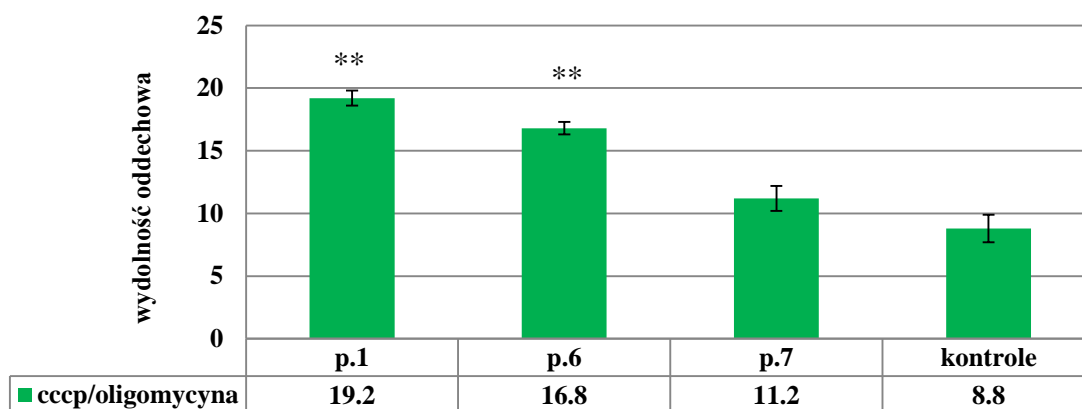
Analiza oddychania komórkowego cybryd wykazała, że cybrydy z dwiema mutacjami LHON linii p.1 i p.7 we wszystkich warunkach pomiaru, zarówno w warunkach podstawowych jak i po dodaniu substratów oddechowych oraz oligomycyny i rozpręgacza fosforylacji oksydacyjnej, wykazują wyższy poziom oddychania niż komórki bez mutacji. W linii p.6 zanotowano porównywalny poziom oddychania z komórkami kontrolnymi w warunkach inhibicji syntazy ATP, natomiast w pozostałych warunkach pomiaru szybkość oddychania komórek tej linii była wyższa niż ta dla komórek kontrolnych. Wyniki analizy oddychania komórkowego cybryd przedstawiono na wykresie 5.



**Wykres 5. Szybkość oddychania w linii komórkowej cybryd.** Szybkość oddychania przedstawiono jako szybkości zużycia tlenu w warunkach podstawowych i po dodaniu kolejnych odczynników (pirogronian, glutaminian, oligomycyna, cccp). Podano wyniki uśrednione dla czterech powtórzeń. p.1, p.6, p.7 - linie cybryd z dwiema mutacjami LHON, k - komórki kontrolne. Gwiazdkami oznaczono wyniki istotne statystycznie (\* dla  $p < 0,05$ , \*\* dla  $p < 0,01$ ).

W dwóch liniach cybryd z dwiema mutacjami LHON, w liniach p.1 i p.6, zaobserwowano wyższą wydolność oddechową w stosunku do komórek osób z grupy kontrolnej. W linii cybryd p.1 wydolność oddechowa była wyższa o 118% w stosunku do komórek kontrolnych, a w linii p.6 wyższa o 91%. Wyniki analizy wydolności oddechowej przedstawiono na wykresie 6.





**Wykres 6. Wydolność oddechowa cybryd o różnym poziomie mutacji.** Podano wyniki uśrednione dla czterech powtórzeń. p.1, p.6, p.7 - linie cybryd z dwiema mutacjami LHON. Gwiazdkami oznaczono wyniki istotne statystycznie (\*\* dla  $p < 0,01$ ).

Gdy porównano poziom mutacji LHON w tych cybrydach z poziomem ich wydolności oddechowej zauważono, że wraz ze wzrostem poziomu mutacji m.11778G>A wzrasta wydolność oddechowa komórki. Dla mutacji m.3460G>A nie zauważono takiej korelacji. Porównanie poziomu mutacji LHON z wydolnością oddechową komórek linii cybryd przedstawiono tabeli 24.

**Tabela 24. Porównanie wydolności oddechowej komórek z linii cybryd z poziomem mutacji m.11778G>A i m.3460G>A.** Podano wyniki uśrednione dla czterech powtórzeń wraz z odchyleniem standardowym. Wartości istotne statystycznie zaznaczono w tabeli na żółto (\*\*dla  $p < 0,01$ ).

linie komórkowe	wydolność oddechowa	poziom heteroplazmii m. 11778G>A	poziom heteroplazmii m.3460G>A
p.7	11,2 ± 0,9	34,3% ± 1,1	12,7% ± 0,9
p.6	<b>**16,8 ± 0,5</b>	89,8% ± 0,9	36,6% ± 0,6
p.1	<b>**19,2 ± 0,6</b>	94 % ± 0,5	3 % ± 0,4
kontrole	8,8 ± 1,1	-	-

Wyniki analizy oddychania komórkowego i wydolności oddechowej komórek otrzymane dla cybryd wskazują, że mutacje mitochondrialne wpływają na zmiany w metabolizmie energetycznym komórek. Można się zastanowić czy ten sam poziom mutacji będzie miał taki sam wpływ na możliwość zwiększania wydolności oddechowej w innych typach komórek z mutacjami LHON. Aby odpowiedzieć na pytanie, czy ten sam poziom mutacji LHON powoduje identyczne zmiany wydolności oddechowej we wszystkich typach komórek i czy tło jądrowe modyfikuje wydolność energetyczną komórek, porównano

wydolność oddechową linii cybryd z liniami fibroblastów i limfoblastów o zbliżonym poziomie mutacji. Wybrano linię cybryd p.1, o poziomie mutacji m.11778G>A 94% i m.3460G>A 3% oraz wyselekcjonowano dwie linie fibroblastów i 3 linie limfoblastów o zbliżonym poziomie mutacji:

1) linie fibroblastów:

- a) p.5 o poziomie heteroplazmii m.11778G>A 98% i m.3460G>A 3%
- b) p.7 z o poziomie heteroplazmii m.11778G>A 98% i m.3460G>A 8%

2) linie limfoblastów

- a) p.3 o poziomie heteroplazmii m.11778G>A 98% i m.3460G>A 10%
- b) p.5 o poziomie heteroplazmii m.11778G>A 98% i m.3460G>A 4%
- c) p.6 o poziomie heteroplazmii m.11778G>A 98 i m.3460G>A 6%

Porównanie to wykazało, że w komórkach cybryd o wyżej opisanym poziomie mutacji dochodzi do 118% wzrostu wydolności oddechowej w porównaniu do komórek kontrolnych. Natomiast w komórkach fibroblastów o zbliżonym poziomie mutacji zanotowano 28% spadek (dla p.5) i 7% wzrost (dla p.7) wydolności oddechowej w stosunku do komórek kontrolnych. W komórkach limfoblastów analiza ta wykazała, że przy zbliżonym do cybryd poziomie mutacji wzrost wydolności oddechowej wynosił 39%, 13% i 141% (odpowiednio dla pacjentów p.3, p.5 i p.6).

Przeprowadzone analizy wskazują, że wyniki otrzymane dla komórek cybryd mają charakter jedynie poglądowy na temat wpływu mutacji LHON na metabolizm energetyczny komórek. Mutacje mitochondrialne mogą mieć zmienny wpływ na szybkość oddychania komórek i ich wydolność energetyczną, i jest on zróżnicowany komórkowo oraz uzależniony od rodzaju i poziomu danej mutacji.

### 4.8 Analiza apoptozy w różnych liniach komórkowych

Apoptoza jest najczęściej postulowanym mechanizmem programowanej śmierci przyczyniającej się do degeneracji komórek zwojowych siatkówki w LHON. Jednak dane literaturowe nie wskazują, żeby apoptoza zachodziła w komórkach klasyczną drogą, często nie obserwuje się charakterystycznej dla apoptozy aktywacji kaspaz, dlatego w celu weryfikacji tych wyników, w ramach tej pracy przeprowadzono analizę poziomu apoptozy w komórkach pacjentów z mutacjami LHON oraz komórkach kontrolnych. W celu

sprawdzenia czy posiadanie obu mutacji mtDNA m.3460G>A oraz m.11778G>A sprzyja podwyższonemu poziomowi apoptozy porównano jej poziom w hodowlach unieśmiertelnić limfocytów B, linii fibroblastów i cybryd od osób badanych oraz osób bez mutacji mtDNA stanowiących grupę kontrolną. Analizę przeprowadzano w trzech różnych warunkach hodowlanych (kontrolnym - pożywka pełna z glukozą oraz dwóch stresowych - w pożywce, w której zastąpiono na 24 godziny glukozę 5mM galaktozą oraz w pożywce suplementowanej 2,5μM rotenonem). Galaktoza jest wolno metabolizowana w procesie glikolizy, dlatego komórki hodowane w tych warunkach są zmuszone do produkcji ATP wyłącznie z łańcucha oddechowego (Dott i wsp., 2014). Jeśli komórki wykazują dysfunkcję fosforylacji oksydacyjnej, wtedy ich hodowla na galaktozie pozwoli uwidocznienie te zaburzenia, ponieważ nie będą one w stanie zrekompensować deficytów energetycznych wzmożoną glikolizą i będą w tych warunkach charakteryzować się wyższym poziomem apoptozy. Natomiast rotenon, będący inhibitorem kompleksu I umożliwia określenie czy kompleks ten jest aktywny, jak również umożliwia zbadanie wpływu zwiększonej produkcji ROS na metabolizm komórkowy.

Poziom apoptozy oceniono na cztery następujące sposoby:

- a) Analiza powstawania wolnych nukleosomów. Wolne nukleosomy powstają w wyniku między nukleosomalnej fragmentacji DNA przez endonukleazy aktywowane w trakcie zachodzącej apoptozy. Do oceny liczby wolnych nukleosomów wykorzystano test immunoenzymatyczny Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche) według procedury opisanej w rozdziale Materiały i metody. W teście mierzono absorbancję przy długości fali 405nm, która jest wprost proporcjonalna do liczby wolnych nukleosomów. Analizy dokonywano w czytniku płytek. W teście mierzono liczbę wolnych nukleosomów tylko w warstwie apoptotycznej komórek. Supernatant, w którym mogły znaleźć się wolne nukleosomy uwolnione do roztworu przez komórki nekrotyczne, nie został wykorzystany w tej analizie.
- b) Analiza aktywności kaspaz 3 i 7. Kaspazy wykonawcze, do których można zaliczyć kaspazy 3 i 7 są wytwarzane w formie nieaktywnych prokaspaz, a ich aktywacja odbywa się na zasadzie proteolizy z udziałem kaspaz inicjatorowych. Aktywność kaspaz wykonawczych odzwierciedla intensywność procesu apoptozy. Do zmierzenia aktywności kaspaz zastosowano zestaw Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega), według procedury opisanej w rozdziale Materiały i metody. Jest to test, w którym intensywność

luminescencji jest wprost proporcjonalna do aktywności kaspaz 3 i 7. Analizy dokonywano w czytniku płytek.

- c) Analiza proteolizy polimerazy PAR-1 (PARP-1), będącej jednym z substratów kaspaz wykonawczych. Polimeraza PAR-1 (116kDa) uczestniczy w naprawie uszkodzeń DNA, jednak w momencie aktywacji apoptozy PARP-1 ulega proteolitycznemu cięciu przez kaspazy 3 i 7 na fragmenty o wielkości 89kDa i 27kDa. W analizie z wykorzystaniem techniki western blot sprawdzano poziom natywnej formy białka PARP-1 (116kDa) oraz jej ciętej formy (89kDa) z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko temu białku. Obecność ciętej formy białka PARP-1 (89kDa) świadczy o aktywacji kaspaz i zachodzącej apoptozie.
- d) Mikroskopowa analiza kondensacji chromatyny i fragmentacji jądra komórkowego w komórkach cybryd. W trakcie analizy poziomu autofagii w cybrydach komórki wybarwiano również barwnikiem Hoechst 33342 pozwalającym na wizualizację jąder komórkowych. Wybarwione preparaty obserwowano pod mikroskopem w celu oceny obecności charakterystycznych dla apoptozy cech jak kondensacja chromatyny i fragmentacja jądra komórkowego.

Wyniki analizy aktywności kaspaz w linii komórkowej limfoblastów i fibroblastów weszły również w skład pracy magisterskiej Diany Senator pt.: „Autofagia a apoptoza w dziedzicznej neuropatii nerwu wzrokowego Lebera”, wyniki analizy aktywności kaspaz i ilości wolnych nukleosomów w linii komórkowej cybryd weszły również w skład pracy magisterskiej Agaty Kulickiej pt.: „Hybrydy transmitochondrialne, jako model komórkowy dziedzicznej neuropatii wzrokowej Lebera”, wyniki analizy ilości wolnych nukleosomów w linii fibroblastów hodowanych na 5mM galaktozie weszły również w skład pracy licencjackiej Zuzanny Staszczak pt.: „Analiza apoptozy w fibroblastach pacjentów z dziedziczną neuropatią wzrokową Lebera”, a wyniki analizy ilości wolnych nukleosomów oraz analizy proteolizy białka PARP-1 w liniach limfoblastów i fibroblastów hodowanych z 2,5μM rotenonem weszły w skład pracy magisterskiej Klaudii Karwowskiej pt.: „Odpowiedź komórkowa na stres oksydacyjny w dziedzicznej neuropatii wzrokowej Lebera”. Byłam opiekunem wszystkich wyżej wymienionych prac.

Wyniki analiz ilości wolnych nukleosomów i aktywności kaspaz 3 i 7 w liniach komórkowych limfoblastów, fibroblastów i cybryd wraz z błędem standardowym pomiarów przedstawiono na wykresach 7-12. Istotność różnic między wynikami otrzymanymi dla

komórek hodowanych w pożywce standardowej a hodowanymi w 5mM galaktozie lub z 2,5μM rotenonem oceniono testem t Studenta dla prób zależnych. Wyniki analizy testu t Studenta dla linii komórkowych limfoblastów, fibroblastów i cybryd przedstawiono w suplemencie 4. Wyniki analizy proteolizy białka PARP-1 w badanych liniach komórkowych przedstawiono na rysunkach 34, 35 i 36.

### **Linie komórkowe limfoblastów**

Przeprowadzone analizy na liniach komórkowych limfoblastów wykazały, że w warunkach hodowli z 5mM galaktozą w dwóch liniach komórkowych, zdrowej nosicielki dwóch mutacji LHON i zdrowej nosicielki mutacji m.11778G>A występuje istotny statystycznie wzrost ilości wolnych nukleosomów. W pozostałych liniach limfoblastów pacjentów jak i osób z grupy kontrolnej poziom wolnych nukleosomów w tych warunkach hodowli nie różnił się od poziomu ocenionego w glukozie, co świadczy o braku indukcji apoptozy w tych warunkach. W warunkach braku dostępności glukozy w pożywce komórki nie mogły uruchamiać glikolizy i były zmuszone do produkcji ATP jedynie w procesie mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej. Zwiększona śmiertelność dwóch linii komórkowych zdrowych nosicieli mutacji LHON na galaktozie może sugerować dysfunkcje fosforylacji oksydacyjnej w tych komórkach, które są maskowane wzmożoną glikolizą. Brak indukcji apoptozy na galaktozie w pozostałych liniach komórkowych może sugerować, że albo komórki miały sprawny łańcuch oddechowy albo posiadały inny niż wzmożona glikoliza mechanizm kompensujący produkcję ATP. Jednocześnie w tych samych warunkach hodowli we wszystkich liniach zanotowano spadek aktywności kaspaz, istotny statystycznie w liniach pacjentów p.1, p.3, p.7 i u zdrowej nosicielki m.11778G>A.

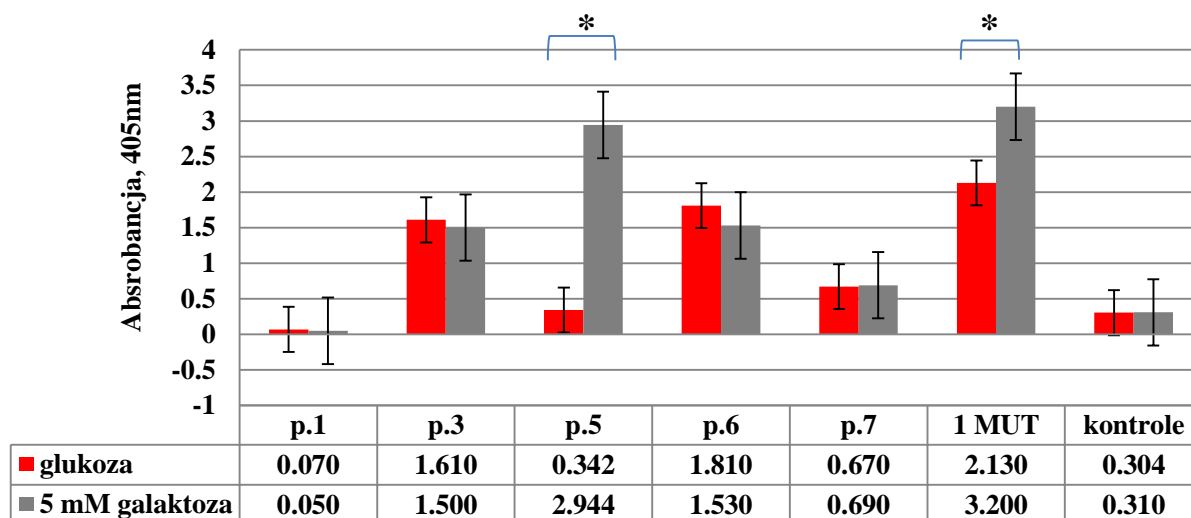
W warunkach hodowli z 2,5μM rotenonem obserwuje się wzrost poziomu fragmentacji DNA we wszystkich liniach limfoblastów, przy czym największy, istotny statystycznie wzrost zaobserwowano w liniach pacjentów p.5 i p.6. We wszystkich liniach limfoblastów wzrostowi fragmentacji DNA w warunkach hodowli z rotenonem w przeciwieństwie do hodowli z 5mM galaktozą towarzyszył również wzrost aktywności kaspaz, najistotniejszy w liniach pacjenta p.1 i zdrowej nosicielki dwóch mutacji LHON.

Uzyskane wyniki wskazują na różnice w indukcji kaspaz wykonawczych w odmiennych warunkach hodowlanych. Nie zaobserwowano także zwiększonej indukcji apoptozy komórek z dwiema mutacjami LHON w stosunku do linii komórkowej tylko z jedną

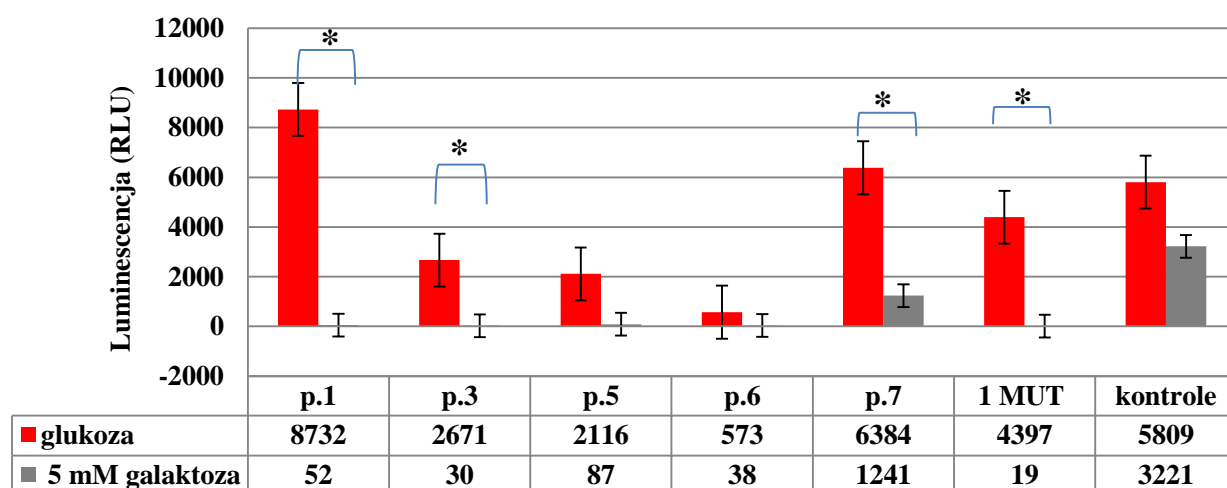
mutacją m.11778G>A. Taki wynik wskazuje, że obie mutacje nie działają synergistycznie w tym typie komórek i nie powodują spotęgowanych zaburzeń metabolicznych uwrażliwiających je na apoptozę bardziej niż komórki tylko z jedną mutacją. Analizę liczby wolnych nukleosomów i aktywności kaspaz w liniach komórkowych limfoblastów w hodowli z glukozą, galaktozą i rotenonem przedstawiono na wykresach 7 - 8 A i B.

Podstawowa liczba wolnych nukleosomów i aktywności kaspaz (w warunkach hodowli limfoblastów z glukozą) będąca punktem odniesienia do analiz indukcji apoptozy galaktozą i rotenonem nie jest identyczna dla obu warunków stresowych, ze względu na fakt, że pomiary apoptozy indukowanej tymi czynnikami przeprowadzano w odrębnych eksperymentach w odstępie kilku tygodni.

**Analiza liczby wolnych nukleosomów i aktywności kaspaz 3 i 7 w liniach komórkowych limfoblastów hodowanych z 5mM galaktozą.**



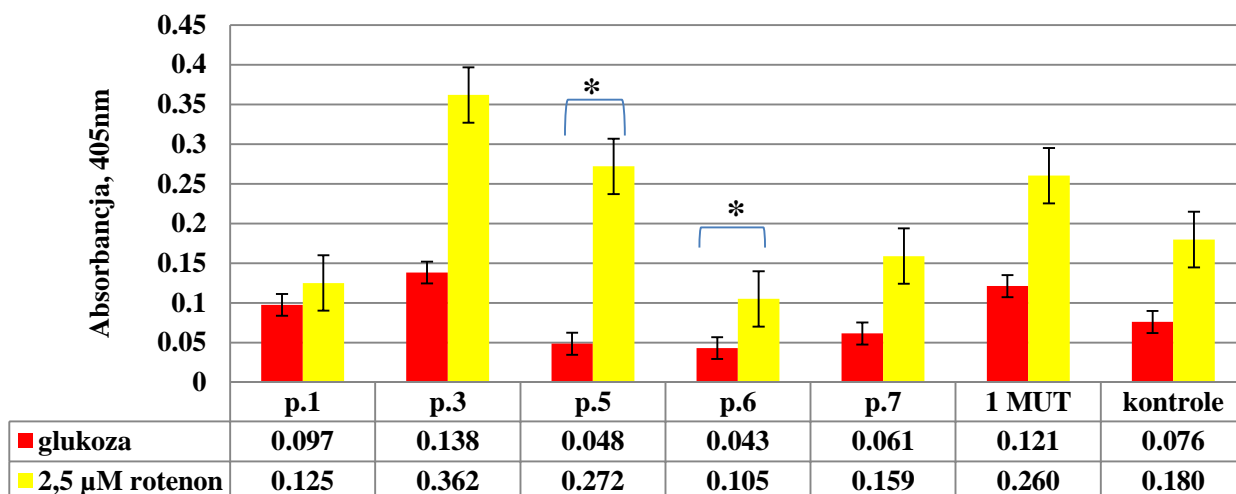
Wykres 7A.



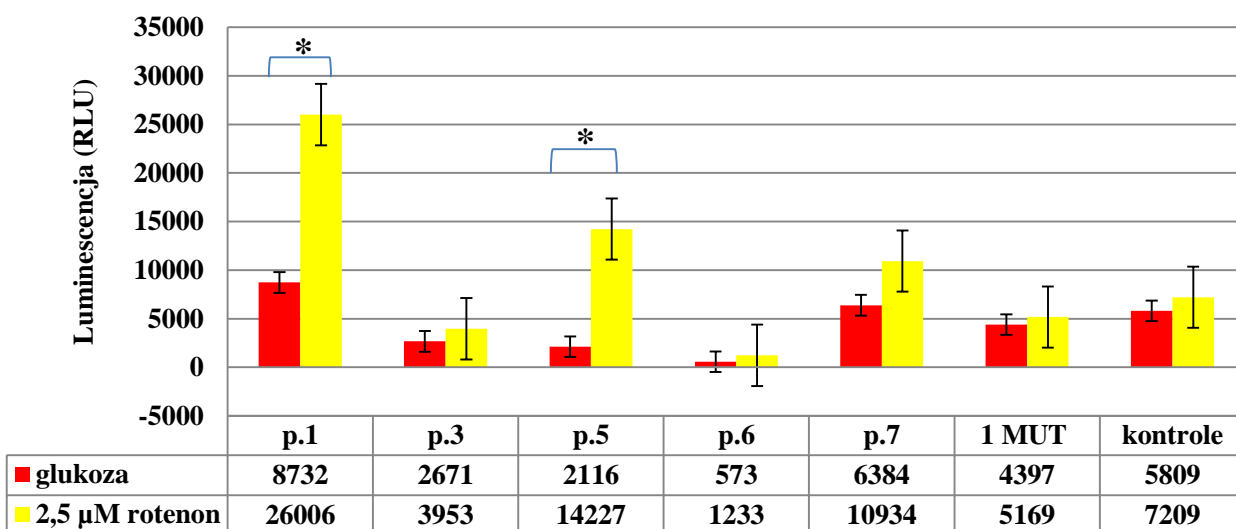
Wykres 7 B.

**Wykres 7. Analiza liczby wolnych nukleosomów (A) i aktywności kaspaz 3 i 7 (B) w liniach komórkowych limfoblastów z mutacjami LHON oraz kontroli.** Komórki limfoblastów hodowano w warunkach standardowych (pożywka z glukozą) oraz przez 24 godziny z 5mM galaktozą. Poziom absorbancji, który jest wprost proporcjonalny do liczby wolnych nukleosomów, mierzono przy długości fali 405nm. Poziom luminescencji (RLU- relative light units) jest wprost proporcjonalny do aktywności kaspaz 3 i 7. Podano wyniki uśrednione dla 3 powtórzeń z błędem standardowym pomiarów w postaci słupków błędów. 1 MUT oznacza linię limfoblastów zdrowej nosicielki mutacji m.11778G>A, p.1, p.3, p.5, p.6, p.7 - linie limfoblastów pacjentów z dwiema mutacjami LHON (m.11778G>A i m.3460G>A), kontrole - linie limfoblastów kontrolnych bez mutacji w mtDNA. Gwiazdkami oznaczono wyniki różne istotnie statystycznie (\* dla  $p<0,05$ ; \*\* dla  $p<0,01$ ).

**Analiza liczby wolnych nukleosomów i aktywności kaspaz 3 i 7 w liniach komórkowych limfoblastów hodowanych z 2,5μM rotenonem.**



Wykres 8A.



Wykres 8B.

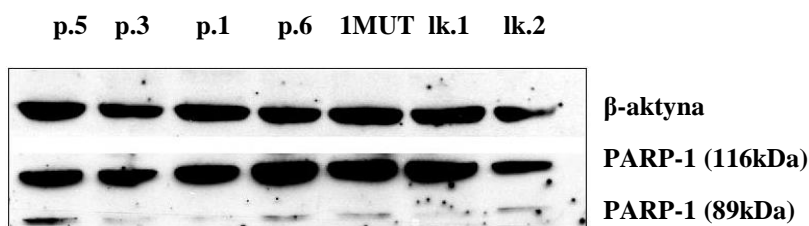
**Wykres 8. Analiza liczby wolnych nukleosomów i aktywności kaspaz 3 i 7 w liniach komórkowych limfoblastów z mutacjami LHON oraz kontroli.** Komórki limfoblastów hodowano w warunkach standardowych (pożywka z glukozą) oraz przez 24 godziny z 2,5μM rotenonem. Poziom absorbancji, który jest wprost proporcjonalny do liczby wolnych nukleosomów, mierzono przy długości fali 405nm. Poziom luminescencji (RLU- relative light units) jest wprost proporcjonalny do aktywności kaspaz 3 i 7. Podano wyniki uśrednione dla 3 powtórzeń z błędem standardowym pomiarów w postaci słupków błędów. 1 MUT oznacza linię limfoblastów zdrowej nosicielki mutacji m.11778G>A, p.1, p.3, p.5, p.6, p.7 - linie limfoblastów pacjentów z dwiema mutacjami LHON (m.11778G>A i m.3460G>A), kontrole - linie limfoblastów kontrolnych bez mutacji w mtDNA. Gwiazdkami oznaczono wyniki różne istotnie statystycznie (\* dla  $p<0,05$ ; \*\* dla  $p<0,01$ ).



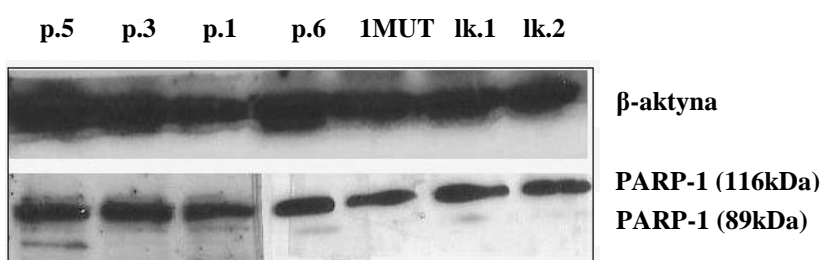
Wyniki luminescencyjnej analizy aktywności kaspaz dla limfoblastów pokrywają się z wynikami analizy proteolizy białka PARP-1, im wyższa była aktywność kaspaz, tym więcej można było zaobserwować ciętej formy tego białka (89kDa). W linii limfoblastów zdrowych nosicielek mutacji LHON w hodowli z 5mM galaktozą luminescencyjnie określony spadek aktywności kaspaz, potwierdzono również niższą proteolizą białka PARP-1. Wzrostowi aktywności kaspaz na rotenonie towarzyszyła także zwiększona proteoliza białka PARP-1.

Wyniki te sugerują, że w liniach komórkowych limfoblastów aktywność kaspaz była uzależniona od warunków hodowli – w galaktozie apoptoza zachodziła na drodze niezależnej od kaspaz, a na rotenonie z udziałem tych proteaz. Obecność dodatkowego prążka w trakcie proteolizy PARP-1 w warunkach hodowli z rotenonem w komórkach limfoblastów wszystkich pacjentów i osób z grupy kontrolnej, który nie jest charakterystycznym produktem proteolizy przez kaspazy wykonawcze 3 i 7, wskazuje, że komórki limfoblastów w tych warunkach mogły oprócz apoptozy wykazywać cechy również innej śmierci komórkowej. Wyniki analizy proteolizy białka PARP-1 w liniach komórkowych limfoblastów w hodowli z glukozą, galaktozą i rotenonem przedstawiono na rysunkach 34 A, B i C.

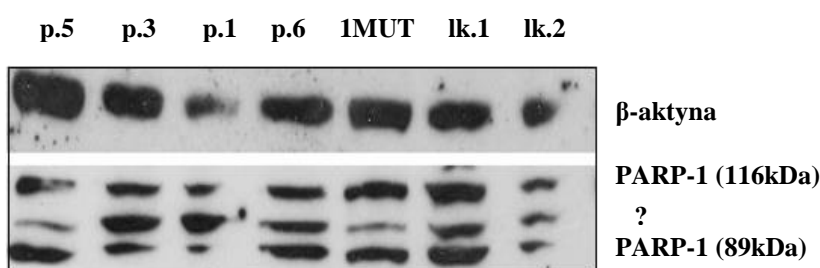
**Analiza proteolizy białka PARP-1 w liniach komórkowych limfoblastów hodowanych w warunkach standardowych oraz z 5mM galaktozą lub 2,5μM rotenonem.**



Rysunek 34A.



Rysunek 34B.



Rysunek 34C.

**Rysunek 34. Analiza proteolizy białka PARP-1 w linii komórkowej limfoblastów.** Komórki hodowano w pożywce standardowej (A) oraz przez 24 godziny w pożywce z 5mM galaktozą (B) lub z 2,5μM rotenonem (C). β-aktyna jako kontrola. W warunkach standardowych jak i w hodowli z 5mM galaktozą przeważa forma natywna 116kDa białka PARP-1, ale widoczne są także delikatne prążki formy ciętej 89kDa. W warunkach hodowli z rotenonem widoczne są obie formy - natywna 116kDa i cięta białka PARP-1 a także prążek o pośredniej wielkości, który nie powstaje w wyniku cięcia przez kaspazę 3 i 7. p.5, p.3, p.1, p.6 - linie limfoblastów pacjentów z dwiema mutacjami LHON (m.11778G>A i m.3460G>A), 1 MUT – linia limfoblastów zdrowej nosicielki mutacji m.11778G>A, lk.1, lk.2 – linie limfoblastów kontrolnych bez mutacji, ? – prążek nieznanego pochodzenia.

### **Linie komórkowe fibroblastów**

Przeprowadzone analizy na komórkach fibroblastów z mutacjami LHON jak i kontrolnych wykazały, że poziom podstawowej aktywności kaspaz wykonawczych w tych komórkach jest niższy w porównaniu do komórek limfoblastów.

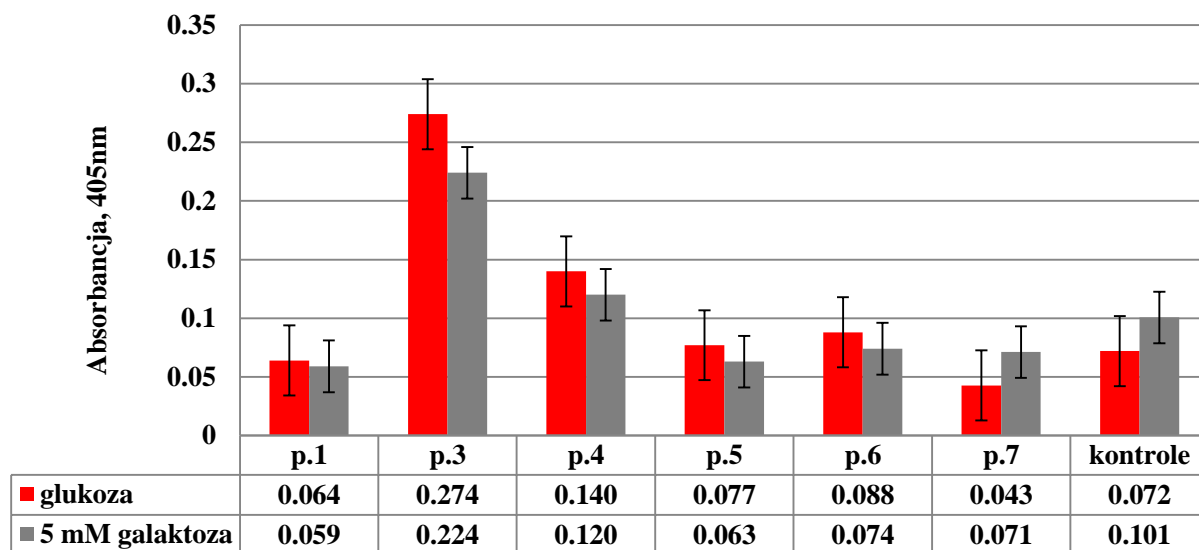
Analizy hodowli fibroblastów w warunkach stresowych wykazały, że zastąpienie w pożywce glukozy galaktozą nie wpłynęło na zwiększenie liczby wolnych nukleosomów zarówno w komórkach z mutacjami LHON jak i kontrolnych. Wynik taki sugeruje, że warunki stresu metabolicznego nie wywołały w badanych komórkach wzrostu poziomu apoptozy. Aktywność kaspaz w tych warunkach także pozostawała we wszystkich liniach fibroblastów na zbliżonym poziomie. Zwiększona śmiertelność komórek na galaktozie wskazywałaby upośledzenie fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach komórek, natomiast brak takiej obserwacji oznacza, że mimo obecności mutacji wywołujących LHON fibroblasty nie wykazują deficytów metabolicznych związanych z łańcuchem oddechowym, co dodatkowo potwierdza fakt, że u badanych pacjentów w tej tkance nie obserwuje się objawów choroby.

Warto zwrócić uwagę, że na galaktozie nie zaobserwowano śmierci komórek fibroblastów zdrowej nosicielki dwóch mutacji LHON, którą zanotowano w jej limfoblastach, mimo że poziom mutacji w obu typach komórek tej pacjentki był niemal identyczny (97%/4% m.11778G>A/m.3460G>A dla linii limfoblastów i odpowiednio 97%/3% dla linii fibroblastów). Może to wskazywać na różnice we wrażliwości na czynniki stresowe między komórkami, a także sugerować specyficzność komórkową ekspresji niektórych mutacji mitochondrialnych.

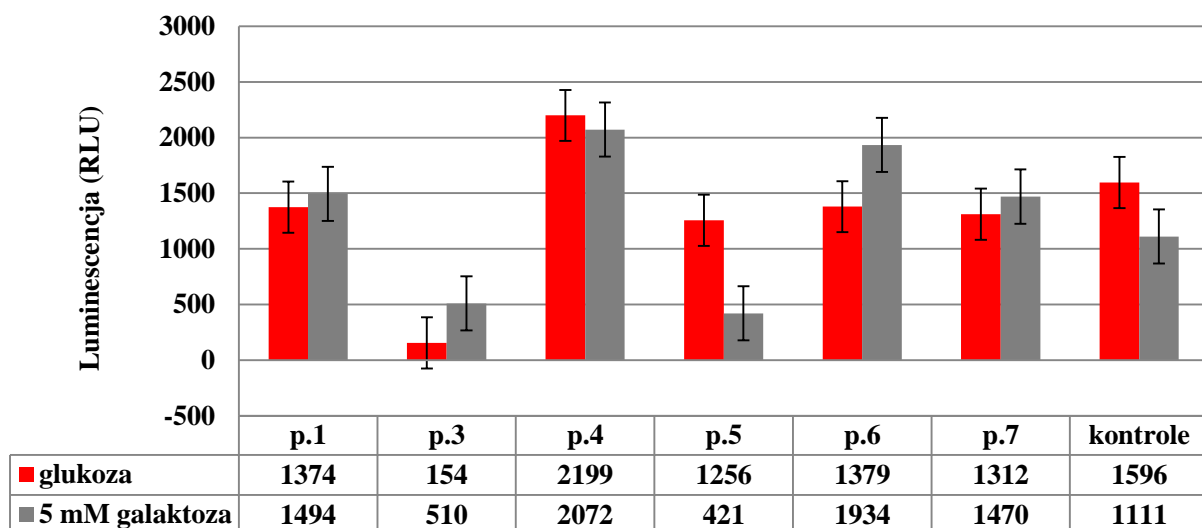
W warunkach hodowli z rotenonem także nie widać istotnych statystycznie różnic zarówno w liczbie wolnych nukleosomów jak i aktywności kaspaz wykonawczych między komórkami z mutacjami LHON i bez mutacji. Uzyskane wyniki wskazują, że obecność mutacji LHON w fibroblastach nie zwiększa ich podatności na programowaną śmierć komórkową.

Analizę liczby wolnych nukleosomów i aktywności kaspaz w liniach komórkowych fibroblastów w hodowli z glukozą, galaktozą i rotenonem przedstawiono na wykresach 9 - 10 A i B.

**Analiza liczby wolnych nukleosomów i aktywności kaspaz 3 i 7 w liniach komórkowych fibroblastów hodowanych z 5mM galaktozą.**



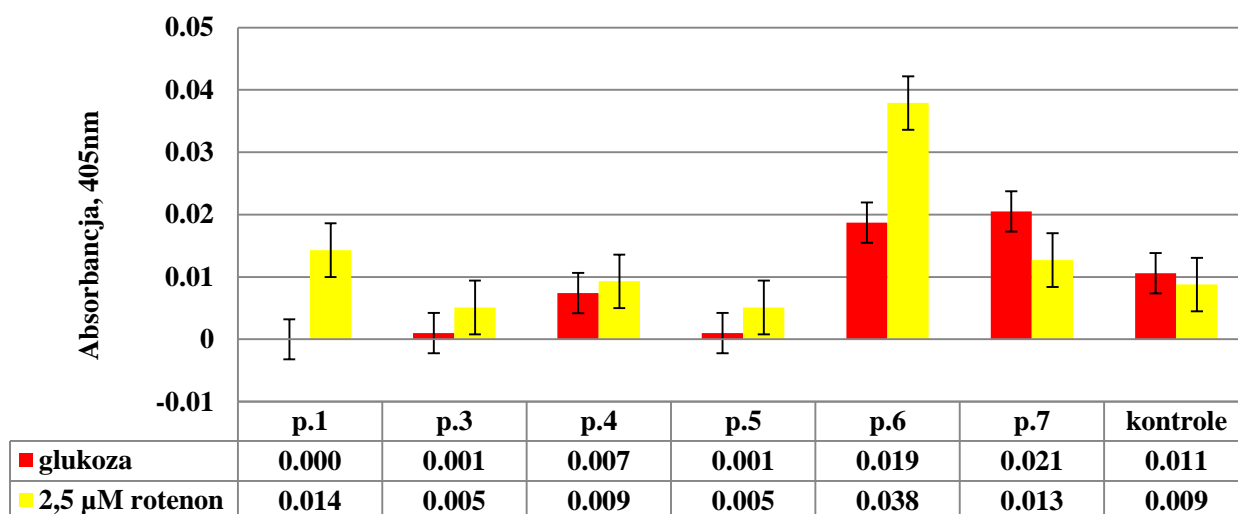
Wykres 9A.



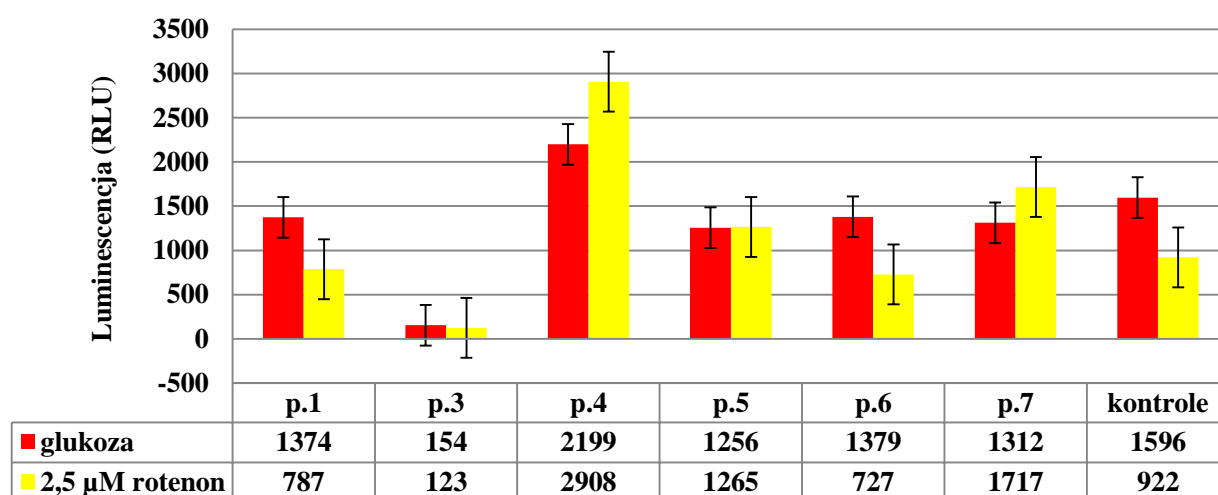
Wykres 9B.

**Wykres 9. Analiza liczby wolnych nukleosomów (A) i aktywności kaspaz 3 i 7 (B) w liniach komórkowych fibroblastów z mutacjami LHON oraz kontroli.** Komórki fibroblastów hodowano w warunkach standardowych (pożywka z glukozą) oraz przez 24 godziny z 5mM galaktozą. Poziom absorbancji, który jest wprost proporcjonalny do liczby wolnych nukleosomów, mierzono przy długości fali 405nm. Poziom luminescencji (RLU- relative light units) jest wprost proporcjonalny do aktywności kaspaz 3 i 7. Podano wyniki uśrednione dla 3 powtórzeń z błędem standardowym pomiarów w postaci słupków błędów. p.1, p.3, p.4, p.5, p.6, p.7 - linie fibroblastów pacjentów z dwiema mutacjami LHON (m.11778G>A i m.3460G>A), kontrole - linie fibroblastów kontrolnych bez mutacji w mtDNA. Gwiazdkami oznaczono wyniki różne istotnie statystycznie.

**Analiza liczby wolnych nukleosomów i aktywności kaspaz 3 i 7 w liniach komórkowych fibroblastów hodowanych z 2,5μM rotenonem.**



Wykres 10A.



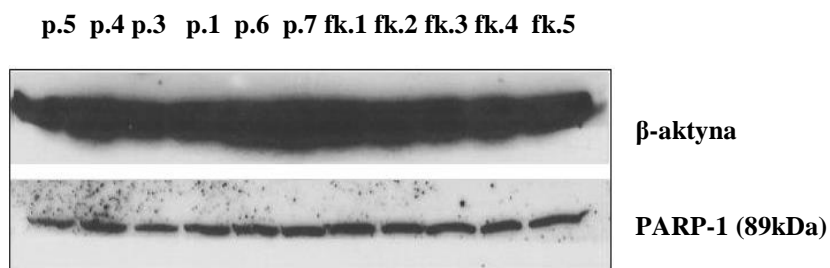
Wykres 10B.

**Wykres 10. Analiza liczby wolnych nukleosomów (A) i aktywności kaspaz 3 i 7 (B) w liniach komórkowych fibroblastów z mutacjami LHON oraz kontroli.** Komórki fibroblastów hodowano w warunkach standardowych (pożywka z glukozą) oraz przez 24 godziny z 2,5μM rotenonem. Poziom absorbancji, który jest wprost proporcjonalny do liczby wolnych nukleosomów, mierzono przy długości fali 405nm. Poziom luminescencji (RLU- relative light units) jest wprost proporcjonalny do aktywności kaspaz 3 i 7. Podano wyniki uśrednione dla 3 powtórzeń z błędem standardowym pomiarów w postaci słupków błędów. p.1, p.3, p.4, p.5, p.6, p.7 - linie fibroblastów pacjentów z dwiema mutacjami LHON (m.11778G>A i m.3460G>A), kontrola - linie fibroblastów kontrolnych bez mutacji w mtDNA. Gwiazdkami oznaczono wyniki różne istotnie statystycznie.

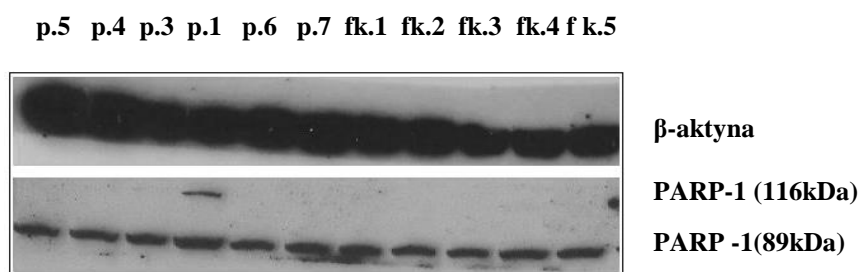
Podstawowa liczba wolnych nukleosomów i aktywności kaspaz (w warunkach hodowli fibroblastów z glukozą) będąca punktem odniesienia do analiz indukcji apoptozy galaktozą i rotenonem nie jest identyczna dla obu warunków stresowych, ze względu na fakt, że pomiary apoptozy indukowanej tymi czynnikami przeprowadzano w odrębnych eksperymentach w odstępie kilku tygodni.

Analizy proteolizy białka PARP-1 wykazały, że we wszystkich warunkach hodowlanych w komórkach fibroblastów, zarówno z mutacjami LHON jak i kontrolnych występowała tylko cięta forma białka PARP-1 (89kDa). Jedynie w linii fibroblastów pacjenta p.1 w warunkach hodowli z galaktozą zaobserwowano delikatny prążek dla formy natywnej białka. Analizę proteolizy białka PARP-1 przedstawiono na rysunku 35 A, B i C.

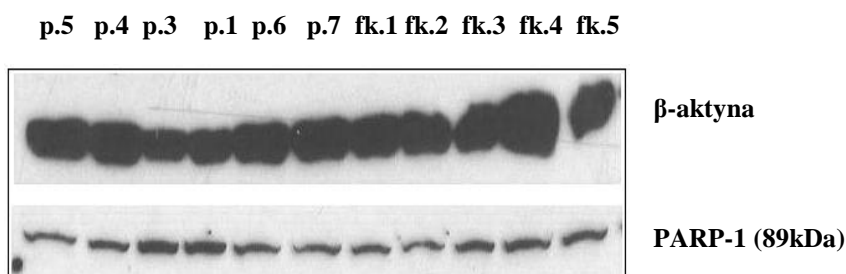
**Analiza proteolizy białka PARP-1 w liniach komórkowych fibroblastów hodowanych w warunkach standardowych oraz z 5mM galaktozą lub 2,5μM rotenonem.**



Rysunek 35A.



Rysunek 35B.



Rysunek 35C.

**Rysunek 35. Analiza proteolizy białka PARP-1 w linii komórkowej fibroblastów.** Komórki hodowano w pożywce standardowej (A) oraz przez 24 godziny w pożywce z 5mM galaktozą (B) lub z 2,5μM rotenonem (C). β-aktyna jako kontrola. We wszystkich warunkach hodowli widoczne są tylko cięte formy białka PARP-1 (89kDa), z wyjątkiem linii p.1 w warunkach hodowli z 5mM galaktozą, gdzie zauważono także delikatny prążek dla formy natywnej (116kDa). p.5, p.4, p.3, p.1, p.6, p.7 - linie fibroblastów pacjentów z dwiema mutacjami LHON (m.11778G>A i m.3460G>A), fk.1 - fk.5: linie fibroblastów kontrolnych bez mutacji (fk.1 - fk.3: kontrole męskie, fk.4 - fk.5 – kontrole żeńskie).

Mimo iż liczba wolnych nukleosomów, poziom aktywacji kaspaz oraz proteolizy PARP-1 między komórkami fibroblastów hodowanych w warunkach standardowych oraz stresowych były niezmiennie, to jednak obserwacje mikroskopowe, wykonane podczas analizy produkcji wolnych rodników tlenowych, wskazały na bardzo istotne różnice. Wcześniejsze analizy mikroskopowe wykazały, że po inkubacji z rotenonem wszystkie komórki kontrolnych fibroblastów były martwe, natomiast fibroblastów z mutacjami LHON nie. Taki wynik wskazuje na mniejszą wrażliwość komórek z mutacjami LHON na działanie rotenonu w porównaniu do komórek kontrolnych.

Identyczny poziom proteolizy białka PARP-1 w komórkach kontrolnych na glukozie i rotenonie, oraz wyraźne różnice w ich przeżywalności obserwowane pod mikroskopem, wskazują na możliwość uruchomienia w warunkach stresu oksydacyjnego także innych ścieżek śmierci komórkowej, w której również dochodzi do proteolizy białka PARP-1. Prążek o wielkości 89kDa jest generowany również w wyniku cięcia PARP-1 przez proteazy lizosomalne - katepsyny B i D (Chaitanya i wsp., 2010). Stosowane przeciwciało wykrywa tylko formę natywną (116kDa) i ciętą (89kDa). Możliwe, że została w tych komórkach uruchomiona inna droga śmierci komórkowej, w której również dochodzi do inaktywacji polimerazy PAR-1 w wyniku czego powstaje produkt o wielkości 89kDa oraz mniejsze, ale niewykrywane w tej analizie.

### **Linie komórkowe cybryd**

Analogiczne analizy procesu apoptozy jak w liniach komórkowych limfoblastów i fibroblastów przeprowadzono także na liniach komórkowych cybryd. Podstawowa aktywność kaspaz cybryd hodowanych w glukozie była wyższa niż ta określona dla fibroblastów, ale niższa niż w liniach limfoblastów.

W warunkach hodowli z 5mM galaktozą wyraźny, istotny statystycznie wzrost fragmentacji DNA zauważono jedynie w komórkach cybryd z mutacjami LHON linii p.3. W hodowli z 2,5μM rotenonem zaobserwowano zwiększony poziom fragmentacji DNA szczególnie w cybrydach z mutacjami LHON linii p.3 i p.6, natomiast poziom apoptozy w cybrydach z mutacjami LHON linii p.4, p5 i p.7 pozostawał na poziomie zbliżonym do komórek kontrolnych. Z obu analiz wynika, że linia komórkowa cybryd p.3 wykazuje zwiększoną podatność na fragmentację DNA, a zatem i do zapoczątkowania apoptozy zarówno w warunkach stresu metabolicznego wywołanego galaktozą jak i wywołanego



zahamowaniem kompleksu I łańcucha oddechowego rotenonem. Natomiast komórki cybryd linii p.6 wykazywały wzrost poziomu wolnych nukleosomów w pożywce z rotenonem, ale tej tendencji nie zaobserwowano w pożywce z galaktozą.

We wszystkich liniach komórkowych cybryd z mutacjami LHON zauważono spadek aktywności kaspazy 3 i 7 w pożywce z 5mM galaktozą, a także z 2,5μM rotenonem, jednak w mniejszym stopniu niż na galaktozie. Spadku aktywności kaspaz nie zauważono w komórkach cybryd kontrolnych w obu warunkach hodowli. W komórkach cybryd z mutacjami LHON linii p.3 spadek aktywności kaspaz na galaktozie w stosunku do pożywki z glukozą wyniósł 62% przy jednoczesnym dwukrotnym wzroście ilości wolnych nukleosomów, a w hodowli z rotenonem spadek aktywności kaspaz wyniósł 38% przy jednoczesnym 2,5 krotnym wzroście ilości wolnych nukleosomów. Natomiast w komórkach linii p.6 o około 90% poziomie m.11778G>A hodowanych z rotenonem zaobserwowano spadek aktywności kaspaz o 65% przy trzykrotnym wzroście liczby wolnych nukleosomów. Takie wyniki wskazują, że w komórkach cybryd z mutacjami LHON apoptoza zachodzi na drodze niezależnej od kaspaz.

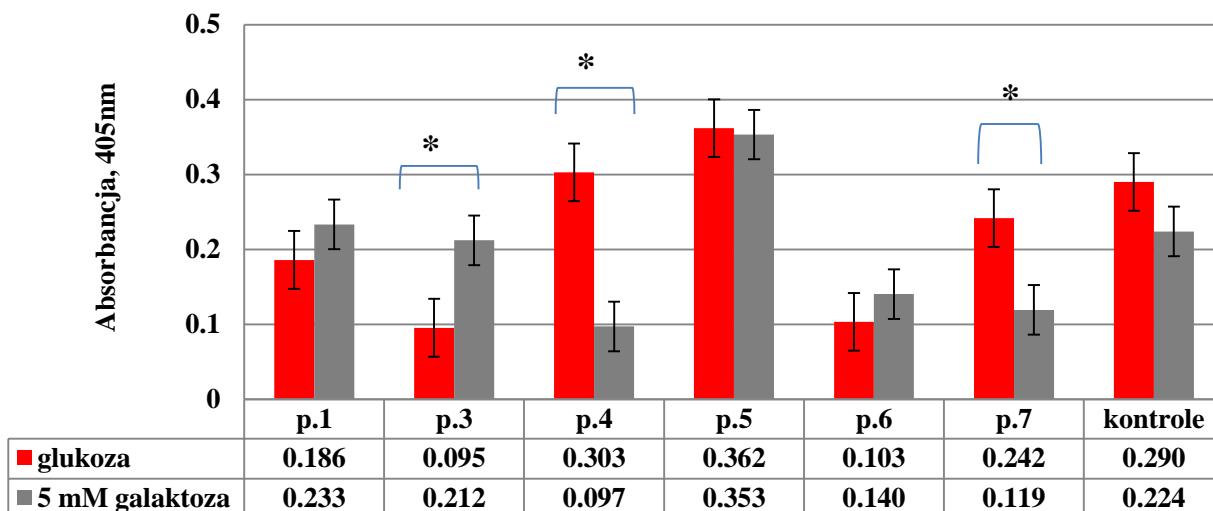
Apoptotyczna śmierć komórek cybryd p.3 na galaktozie sugeruje upośledzenie fosforylacji oksydacyjnej oraz wskazuje, że mogło tu dochodzić do wzmożonej glikolizy, która maskowała dysfunkcje pracy łańcucha oddechowego. Warto zwrócić uwagę, że w komórkach cybryd linii p.3 był wyjątkowo wysoki poziom mutacji m.3460G>A (89,3% ± 0,6).

Najmniejszy efekt na inkubację z rotenonem zaobserwowano w linii p.1, w której zarówno galaktoza jak i rotenon nie wywołał nadmiernej apoptozy. Obserwacje mikroskopowe komórek cybryd linii p.1 poddanych działaniu rotenonu nie wykazały także zmian w produkcji reaktywnych form tlenu. Komórki tej linii mają jednocześnie najwyższy ze wszystkich cybryd poziom mutacji m.11778G>A (~94%), co oznacza, że mogło dojść do obserwowanego także w komórkach fibroblastów z mutacjami LHON uniewrażliwienia się na działanie rotenonu. Wystąpienie apoptozy komórek cybryd linii p.3 i p.6, również o wysokim poziomie mutacji (41% m.11778G>A i 89% m.3460G>A dla p.3 i odpowiednio 90% i 37% dla p.6) w hodowli na rotenonie sugeruje, że są one wrażliwe na działanie tego inhibitora. Analizę liczby wolnych nukleosomów i aktywności kaspaz w liniach komórkowych cybryd w hodowli z glukozą, galaktozą i rotenonem przedstawiono na wykresach 11 - 12 A i B.

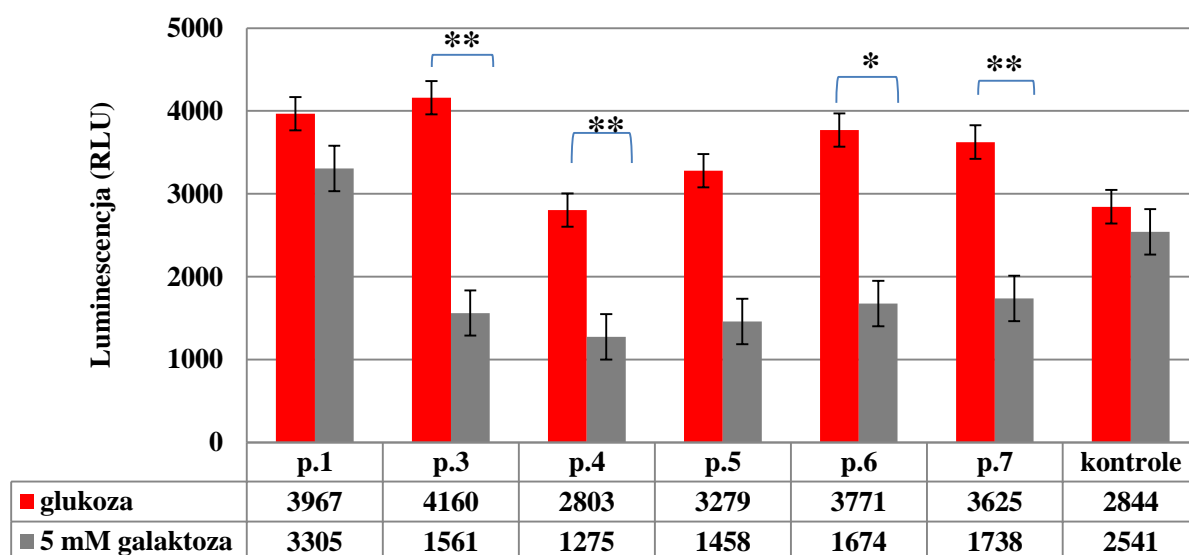
Analiza proteolizy PARP-1 w liniach komórkowych cybryd wykazała, że zarówno w hodowli na glukozie jak i na galaktozie białko to ulega proteolizie na zbliżonym poziomie.

Otrzymane wyniki w tych warunkach hodowlanych potwierdzają wcześniejsze analizy luminescencyjne aktywności kaspaz 3 i 7. Natomiast analiza tego białka wyizolowanego z cybryd hodowanych z rotenonem wskazała na silną proteolizę PARP-1 we wszystkich liniach, chociaż wcześniejsze analizy aktywności kaspaz nie wykazały ich wzmożonej aktywności w tych warunkach, a nawet spadek aktywności w cybrydach z mutacjami LHON o wysokim poziomie mutacji LHON (89% m.3460G>A dla linii p.3 i 90% m.11778G>A dla linii p.6), w których wykazano zwiększoną liczbę wolnych nukleosomów. Oznacza to, że w warunkach inhibicji kompleksu I łańcucha oddechowego w tych liniach komórkowych początkowo kaspazy są aktywne, co potwierdza obecność zdegradowanych substratów tych kaspaz, jednak na późniejszym etapie hodowli może dochodzić do ich inaktywacji. Wyniki analizy proteolizy białka PARP-1 w liniach komórkowych cybryd w hodowli z glukozą, galaktozą i rotenonem przedstawiono na rysunkach 36 A, B i C.

**Analiza liczby wolnych nukleosomów i aktywności kaspaz 3 i 7 w liniach komórkowych cybryd hodowanych z 5mM galaktozą.**



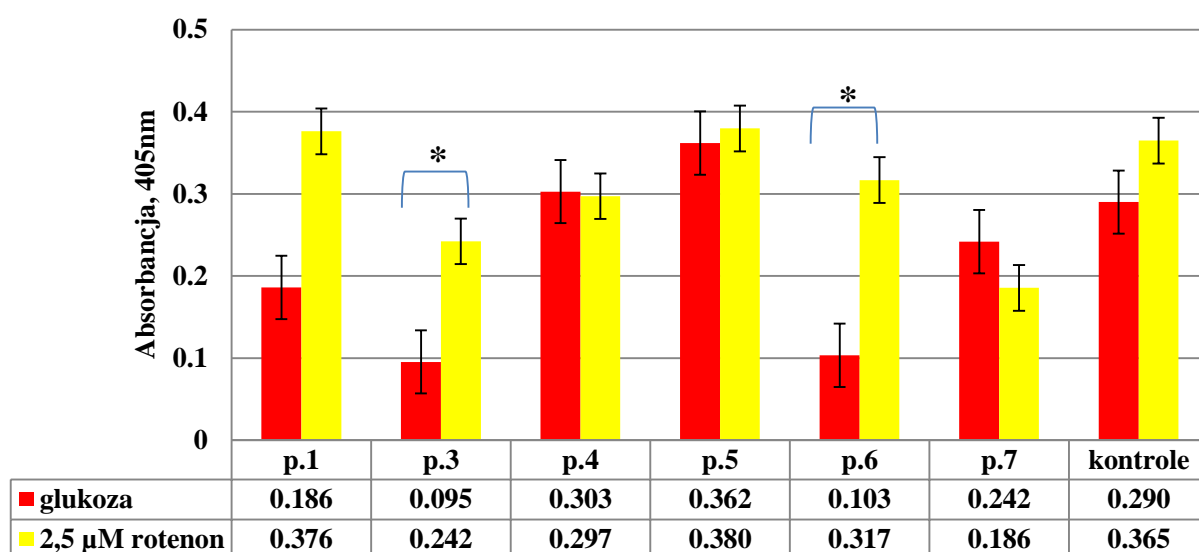
Wykres 11A.



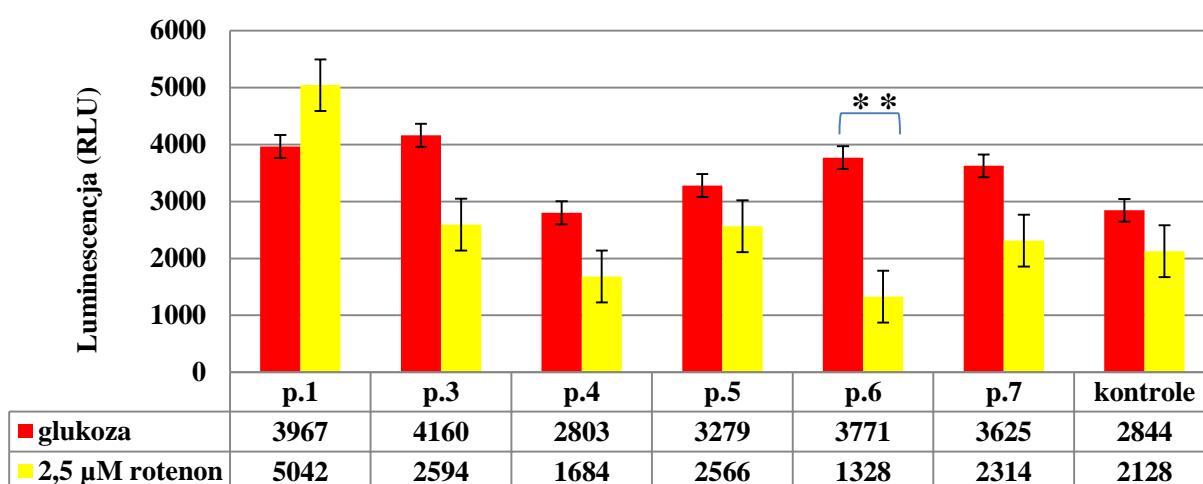
Wykres 11B.

**Wykres 11. Analiza liczby wolnych nukleosomów (A) i aktywności kaspaz 3 i 7 (B) w linii komórkowej cybryd z mutacjami LHON oraz kontroli.** Komórki cybryd hodowano w warunkach standardowych (pożywka z glukozą) oraz przez 24 godziny z 5mM galaktozą. Poziom absorbancji, który jest wprost proporcjonalny do liczby wolnych nukleosomów, mierzono przy długości fali 405nm. Poziom luminescencji (RLU- relative light units) jest wprost proporcjonalny do aktywności kaspaz 3 i 7. Podano wyniki uśrednione dla 3 powtórzeń z błędem standardowym pomiarów w postaci słupków błędów. p.1, p.3, p.4, p.5, p.6, p.7 - linie cybryd z dwiema mutacjami LHON (m.11778G>A i m.3460G>A), kontrola - linie cybryd kontrolnych bez mutacji w mtDNA. Gwiazdkami oznaczono wyniki różne istotnie statystycznie ( \* dla  $p<0,05$ ; \*\* dla  $p<0,01$ ).

**Analiza liczby wolnych nukleosomów i aktywności kaspaz 3 i 7 w liniach komórkowych fibroblastów hodowanych z 2,5μM rotenonem.**



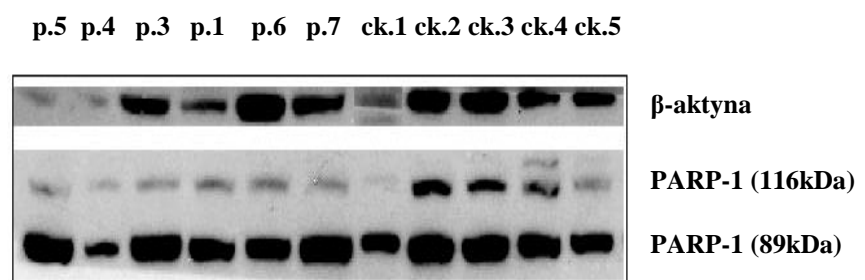
Wykres 12A.



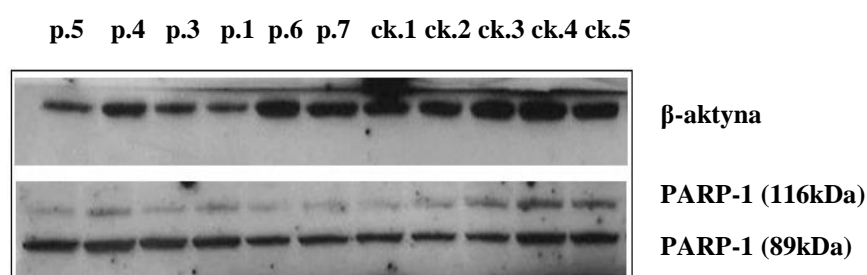
Wykres 12B.

**Wykres 12. Analiza liczby wolnych nukleosomów (A) i aktywności kaspaz 3 i 7 (B) w liniach komórkowych cybryd z mutacjami LHON oraz kontroli.** Komórki cybryd hodowano w warunkach standardowych (pożywka z glukozą) oraz przez 24 godziny z 2,5μM rotenonem. Poziom absorbancji, który jest wprost proporcjonalny do liczby wolnych nukleosomów, mierzono przy długości fali 405nm. Poziom luminescencji (RLU- relative light units) jest wprost proporcjonalny do aktywności kaspaz 3 i 7. Podano wyniki uśrednione dla 3 powtórzeń z błędem standardowym pomiarów w postaci słupków błędów. p.1, p.3, p.4, p.5, p.6, p.7 - linie cybryd z dwiema mutacjami LHON (m.11778G>A i m.3460G>A), kontrola - linie cybryd kontrolnych bez mutacji w mtDNA. Gwiazdkami oznaczono wyniki różne istotnie statystycznie (\*\* dla  $p < 0,01$ ).

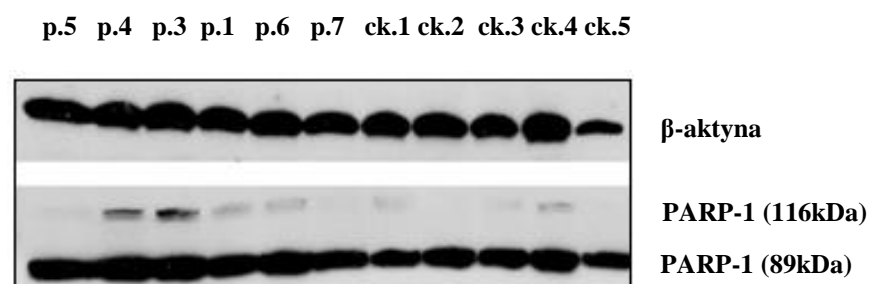
**Analiza proteolizy białka PARP-1 w liniach komórkowych cybryd hodowanych w warunkach standardowych oraz z 5mM galaktozą lub 2,5μM rotenonem.**



Rysunek 36A.



Rysunek 36B.

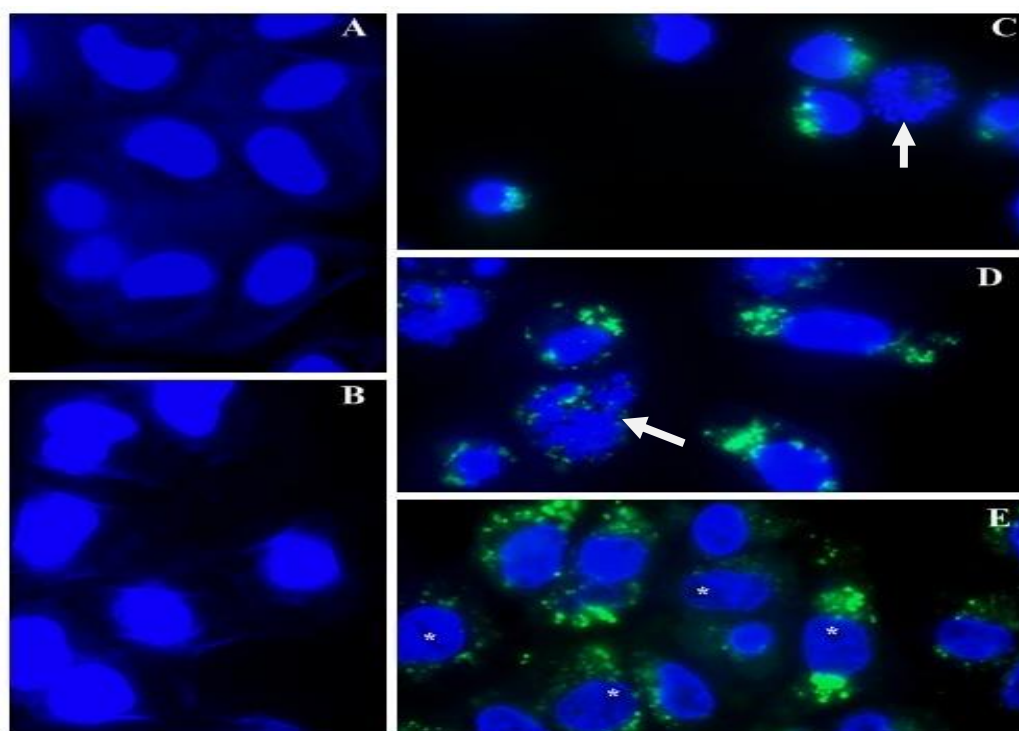


Rysunek 36C.

**Rysunek 36. Analiza western blot dla białka PARP-1 w linii komórkowej cybryd.** Komórki hodowano w pożywce standardowej (A) oraz przez 24 godziny w pożywce z 5mM galaktozą (B) lub z 2,5μM rotenonem (C). β-aktyna jako kontrola. We wszystkich warunkach hodowli widoczne są obie formy białka PARP-1, natywna (116kDa) i cięta (89kDa), z przewagą formy ciętej. Najwyższy poziom formy ciętej PARP-1 zanotowano w warunkach hodowli z rotenonem. Forma natywna w warunkach hodowli z rotenonem występuje na najwyższym poziomie w dwóch liniach cybryd: p.3 i p.4. p.5, p.4, p.3, p.1, p.6, p.7 - linie cybryd z dwiema mutacjami LHON (m.11778G>A i m.3460G>A), ck.1 - ck.5: linie cybryd kontrolnych bez mutacji.

### Analiza mikroskopowa procesu apoptozy

Obserwacje mikroskopowe jąder komórkowych cybryd hodowanych w trzech różnych warunkach hodowlanych (glukoza, 5mM galaktoza lub 2,5μM rotenon) wykazały, że najbardziej wyraźne zmiany w morfologii jąder komórkowych świadczące o aktywacji apoptozy występują w hodowli z 2,5μM rotenonem. Przykładowy obraz mikroskopowy wybarwionych jąder komórkowych cybryd hodowanych w pożywce z glukozą, 5mM galaktozą oraz 2,5μM rotenonem przedstawiono na rysunku 37.



**Rysunek 37. Przykładowy obraz jąder komórkowych komórek cybryd hodowanych w pożywce z glukozą (A), 5mM galaktozą (B) oraz 2,5 μM rotenonem (C, D i E).** Jądra komórkowe barwiono odczynnikami Hoechst 33342 (niebieski sygnał fluorescencji). W pożywce z 2,5μM rotenonem można zauważyć fragmentację jąder komórkowych (oznaczone strzałkami) i kondensację chromatyny (oznaczone gwiazdkami). W pobliżu jąder komórkowych lokują się autofagosomy (zielony sygnał fluorescencji). Przykładowe zdjęcia wykonano przy pomocy obiektywu 60x, użyto filtra FITC przy czasie naświetlania 850ns w celu wizualizacji autofagosomów/autofagolizosomów oraz filtra DAPI przy czasie naświetlania 90ms do wizualizacji jąder komórkowych.

W hodowli z rotenonem zaobserwowano fragmentację jąder komórkowych i kondensację chromatyny, natomiast w glukozie i 5mM galaktozie nie zauważono wyraźnych zmian w integralności jądra komórkowego. Wcześniejsze analizy mikroskopowe produkcji wolnych rodników w warunkach hodowli z rotenonem wykazały również obecność komórek

wykazujących cechy nekrotyczne (rysunek 32). Możliwe, że silny stres oksydacyjny spowodowany zahamowaniem kompleksu I rotenonem w niektórych komórkach doprowadził do indukcji apoptozy a w niektórych nekrozy, w zależności od dostępności ATP w danych warunkach hodowli.

### **Analiza porównawcza procesu apoptozy między liniami komórkowymi**

Na podstawie oceny liczby wolnych nukleosomów i aktywności kaspaz wykonawczych określonych w trzech odmiennych liniach komórkowych oraz mikroskopowej oceny indukcji apoptozy wykazano, że niektóre komórki z mutacjami LHON mają zwiększoną podatność na działanie takich czynników proapoptotycznych, jak galaktoza czy rotenon.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów zauważono zróżnicowaną zarówno pod względem czynników proapoptotycznych zdolność do aktywacji kaspaz, wskazując, że w niektórych warunkach w komórkach z mutacjami LHON dochodzi do aktywacji apoptozy, jednak w procesie tym nie muszą uczestniczyć kaspazy. Ponadto zaobserwowano, że hodowla z galaktozą wzbudziła śmierć apoptotyczną w komórkach limfoblastów zdrowej nosicielki dwóch mutacji LHON, natomiast nie zaindukowała śmierci komórkowej w jej fibroblastach, pomimo obecności obu mutacji w tych dwóch różnych typach komórek na takim samym poziomie. Z tych eksperymentów wynika, że zdolność do indukcji apoptozy w danych warunkach hodowlanych w różnych komórkach o takim samym poziomie mutacji, pochodzących od tego samego pacjenta, nie zawsze jest identyczna.

Zaobserwowano także, że komórki fibroblastów z mutacjami LHON w przeciwieństwie do fibroblastów kontrolnych były niewrażliwe na działanie rotenonu.

We wszystkich liniach komórkowych hodowanych na rotenonie zauważono także proteolizę białka PARP-1. Natomiast w liniach komórkowych limfoblastów hodowla z galaktozą nie zwiększała poziomu proteolizy PARP-1, nawet w hodowlach, w których zanotowano zwiększoną fragmentację DNA. Takie same warunki hodowli nie zwiększały także proteolizy PARP-1 w cybrydach, jednak w obu warunkach hodowli, zarówno z glukozą jak i galaktozą, wykrywano niski poziom formy natywnej tego białka.

Analizy porównawcze wskazują, że poziom podstawowej aktywności kaspaz jest zróżnicowany komórkowo. W komórkach cybryd podstawowa aktywność kaspaz jest wyższa niż w komórkach fibroblastów, ale niższa niż w komórkach limfoblastów. Poziom podstawowej aktywności kaspaz w liniach limfoblastów z mutacjami LHON jest ponad



trzykrotnie wyższy niż w komórkach fibroblastów, a w komórkach limfoblastów z grupy kontrolnej ponad czterokrotnie wyższy niż w fibroblastach.

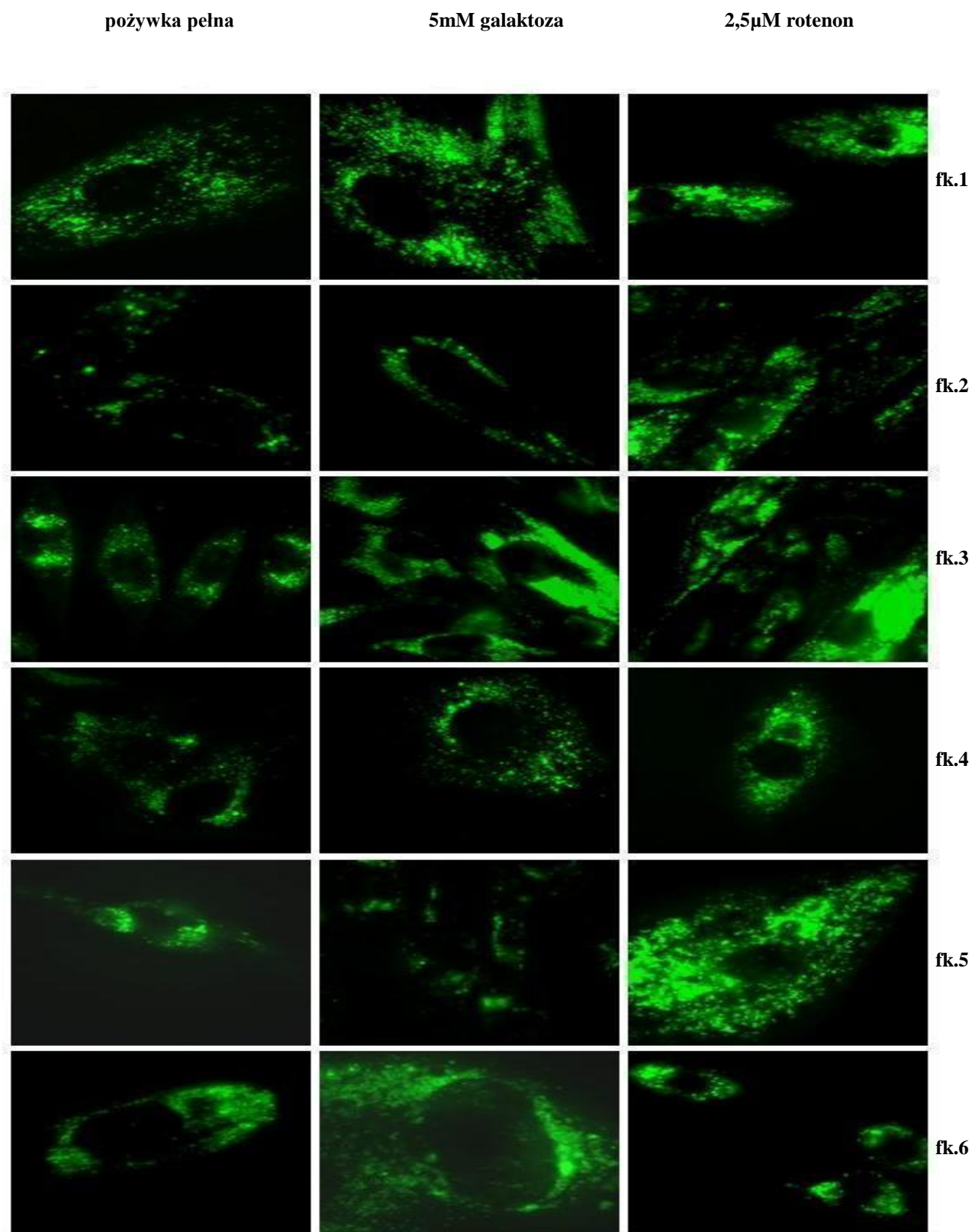
#### **4.9 Badanie wpływu mutacji LHON na przebieg procesu autofagii**

Dotychczas nie zdefiniowano drogi śmierci, na której umierają komórki zwojowe siatkówki w przebiegu LHON, dlatego postanowiono na wyprowadzonych liniach komórkowych oprócz procesu apoptozy przeprowadzić także analizy innego typu śmierci komórkowej - autofagii.

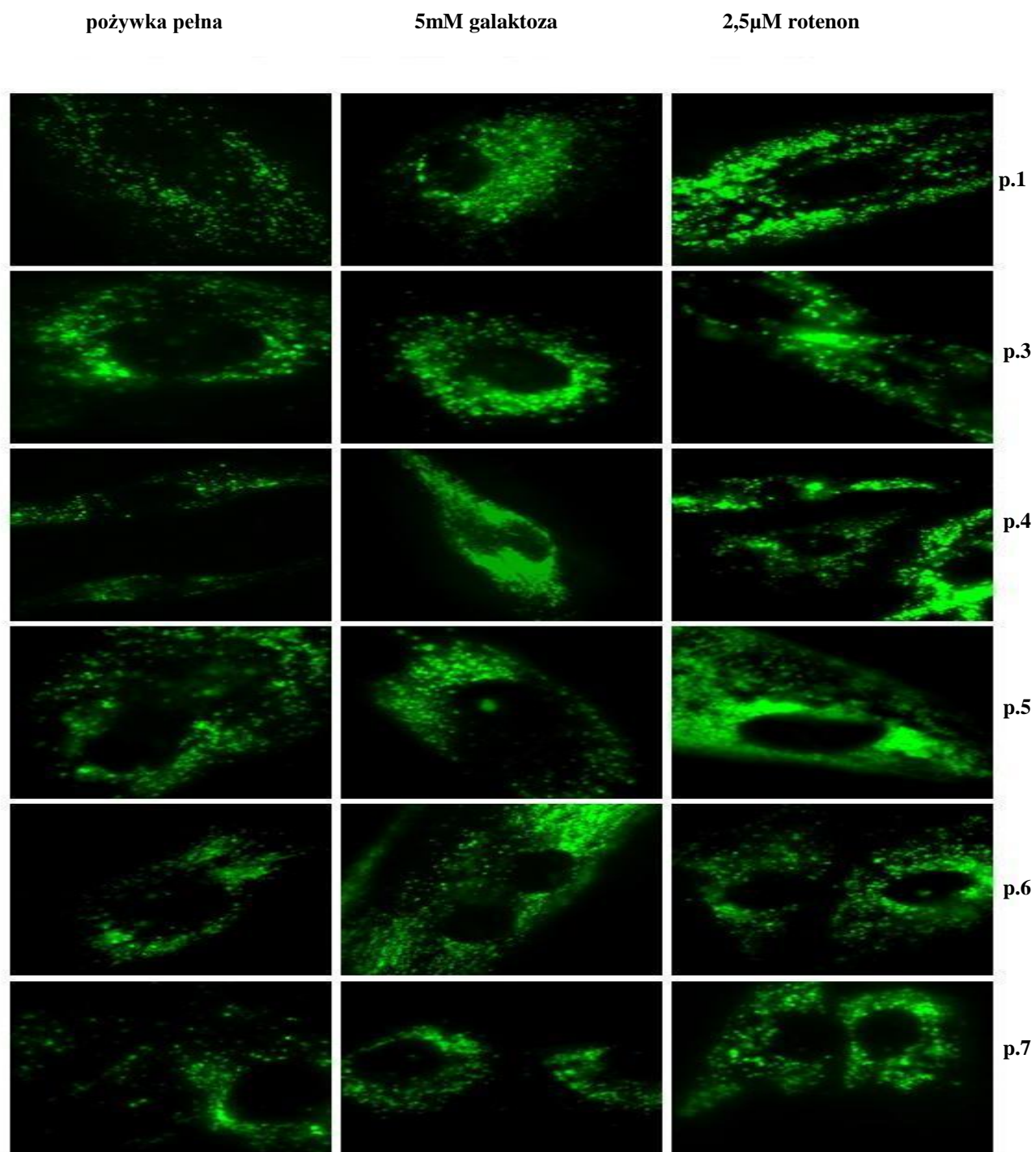
Autofagię analizowano metodą mikroskopową oraz z zastosowaniem techniki western blot. Mikroskopowa analiza polegała na wizualizacji wakuol autofagosomalnych oraz autofagolizosomalnych powstających w miarę postępu procesu autofagii, natomiast w analizie western blot oceniano poziom dwóch białek markerowych autofagii - białka LC3 (izofর্মę I i II) oraz białka p62.

##### **Mikroskopowa analiza autofagii**

Analiza poziomu autofagii na liniach komórkowych fibroblastów i hybryd transmitochondrialnych (cybrd) pacjentów z mutacjami LHON oraz kontrolnych bez mutacji mitochondrialnych została wykonana przy pomocy zestawu Cyto-ID® Autophagy Detection Kit (Enzo Life Sciences), według zaleceń producenta. Analizę przeprowadzono w trzech różnych warunkach hodowlanych (kontrolnym - pożywka pełna z glukozą oraz dwóch stresowych - w pożywce, w której zastąpiono na 24 godziny glukozę 5mM galaktozą oraz w pożywce suplementowanej 2,5µM rotenonem). Analiza z wykorzystaniem zestawu Cyto-ID® Autophagy Detection Kit pozwala na wizualizację wakuoli autofagosomalnych (pre-autofagosomów, autofagosomów i autofagolizosomów). W analizie mikroskopowej rejestrowane jest wzbudzenie fluorescencyjne o zielonej barwie, które jest proporcjonalne do intensywności autofagii. Wyższa intensywność zielonej fluorescencji odzwierciedla wyższą zawartość autofagosomów i autofagolizosomów. Wyniki analizy mikroskopowej intensywności autofagii w liniach fibroblastów przedstawiono na rysunkach 38 A i B, a w liniach cybryd na rysunkach 39 A i B. Wyniki analizy mikroskopowej oceny autofagii w liniach cybryd weszły również w skład pracy magisterskiej Agaty Kulickiej pt.: „Hybrydy transmitochondrialne, jako model komórkowy dziedzicznej neuropatii wzrokowej Lebera”, której byłam opiekunem.

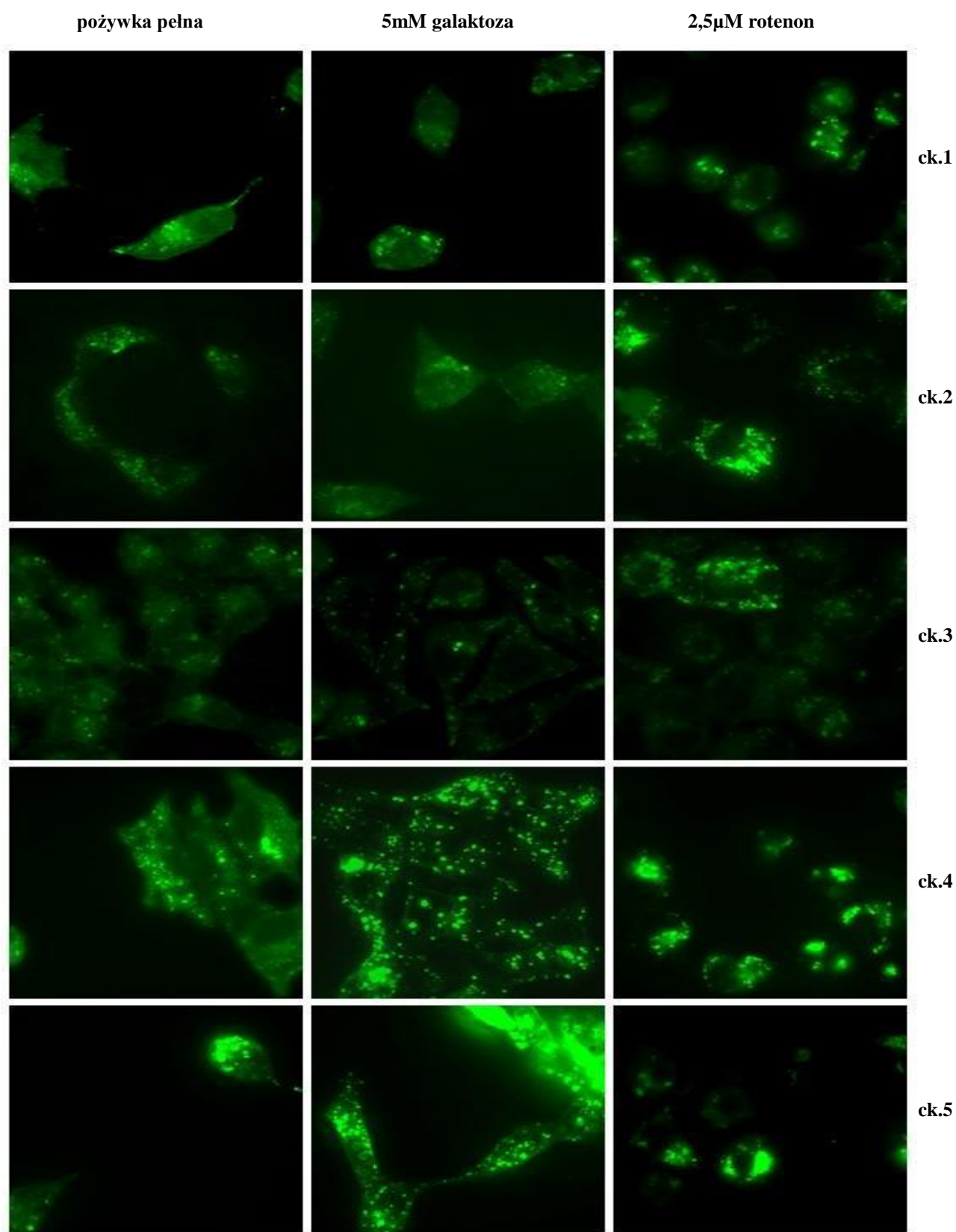


**Rysunek 38A.** Analiza wpływu stresu metabolicznego i oksydacyjnego na indukcję procesu autofagii w liniach komórkowych fibroblastów kontrolnych. fk.1- fk.6 oznaczają kolejne linie komórkowe fibroblastów wyprowadzone od osób z grupy kontrolnej (fk1 - fk.3 - linie żeńskie, fk.4 - fk.6 - linie męskie).



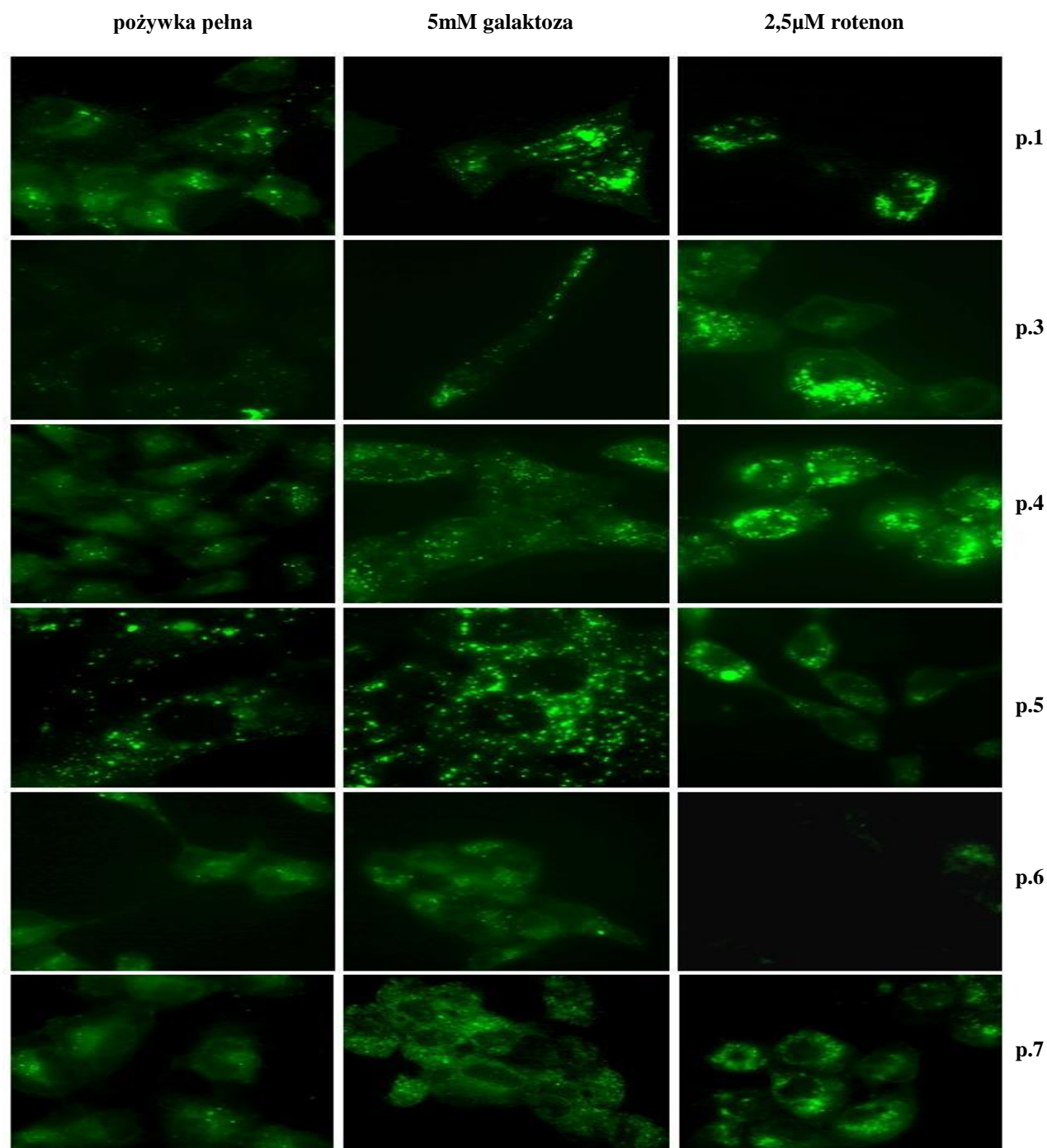
**Rysunek 38B.** Analiza wpływu stresu metabolicznego i oksydacyjnego na indukcję procesu autofagii w liniach komórkowych fibroblastów z mutacjami LHON. p.1 - p.7 oznaczają kolejne linie komórkowe fibroblastów pacjentów z mutacjami m.11778G>A oraz m.3460G>A.

**Rysunek 38 A i B.** Komórki fibroblastów hodowane w warunkach standardowych (pożywka pełna) porównywano z komórkami traktowanymi galaktozą oraz rotenonem. Zielone punkty przedstawiają wakuole autofagosomalne. Przedstawiono reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe wykonane przy pomocy obiektywu 60x i standardowego filtru FITC przy czasie naświetlania 850ns.



**Rysunek 39A. Analiza wpływu stresu metabolicznego i oksydacyjnego na indukcję procesu autofagii w liniach komórkowych cybryd kontrolnych.** ck.1 - ck.5 oznaczają kolejne linie komórkowe cybryd wprowadzone od osób z grupy kontrolnej.





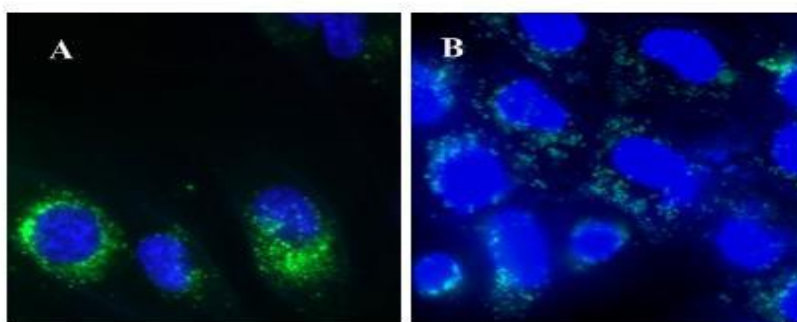
**Rysunek 39B.** Analiza wpływu stresu metabolicznego i oksydacyjnego na indukcję procesu autofagii w linii komórkowej cybryd z mutacjami z m.11778G>A oraz 3460G>A. p.1 - p.7 oznaczają kolejne linie komórkowe cybryd z mutacjami m.11778G>A oraz m.3460G>A.

**Rysunek 39 A i B.** Komórki cybryd hodowane w warunkach standardowych (pożywka pełna) porównywano z komórkami traktowanymi galaktozą oraz rotenonem. Zielone punkty przedstawiają wakuole autofagosomalne. Przedstawiono reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe wykonane przy pomocy obiektywu 60x i standardowego filtru FITC przy czasie naświetlania 850ns.

Analizy mikroskopowe autofagii wykazały, że najwyższą intensywność fluorescencji odzwierciedlającą liczbę autofagosomów i autofagolizosomów w liniach komórkowych fibroblastów pacjentów z LHON oraz grupy kontrolnej zanotowano w warunkach stresu oksydacyjnego i zablokowania kompleksu I łańcucha oddechowego rotenonem (rysunki 38 A i B). Nie zauważono jednak różnic w intensywności fluorescencji wakuol autofagosomalnych między komórkami fibroblastów z mutacjami LHON i osób z grupy kontrolnej we wszystkich warunkach hodowanych.

W liniach komórkowych cybryd hodowla z galaktozą powodowała wyższe gromadzenie się autofagosomów w stosunku do warunków standardowych, ale nie zaobserwowano różnic między komórkami z mutacjami LHON a kontrolnymi. Hodowla cybryd z rotenonem skutkowała wyższą akumulacją autofagosomów niż w warunkach hodowli z glukozą i galaktozą, a najwyższe nagromadzenie zaobserwowano w cybrydach z mutacjami LHON linii p.3, p.4 i p.5. Fluorescencja odzwierciedlająca poziom autofagii w komórkach cybryd kontrolnych hodowanych z rotenonem była nieznacznie niższa w porównaniu do komórek z mutacjami LHON (rysunki 39 A i B). W linii cybryd p.6 nie widać większych różnic w akumulacji autofagosomów między warunkami hodowli z glukozą a galaktozą, natomiast w warunkach stresu oksydacyjnego zauważono znaczny spadek intensywności fluorescencji, co oznacza, że poziom autofagii w tych warunkach był znacznie niższy niż w warunkach standardowej hodowli.

Mikroskopowa analiza lokalizacji komórkowej autofagosomów i autofagolizosomów powstałych w momencie indukcji autofagii wykazała, że wakuole autofagolizosomalne lokalizują się w obszarze jądra komórkowego (rysunek 40).



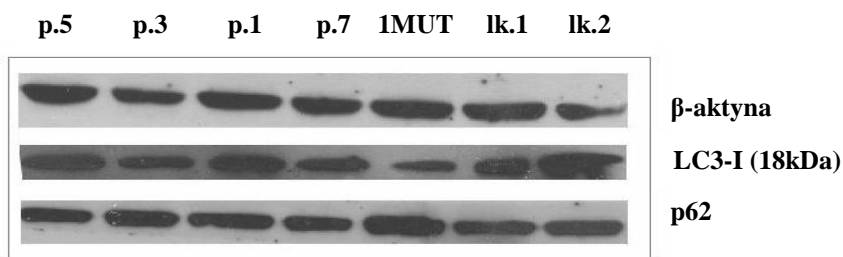
**Rysunek 40. Lokalizacja komórkowa autofagosomów/autofagolizosomów.** Autofagosomy (zielony sygnał fluorescencji) lokalizują się peryferyjnie względem jądra komórkowego (niebieski sygnał fluorescencji) zarówno w fibroblastach (A) jak i cybrydach (B). Przykładowe zdjęcia wykonano przy pomocy obiektywu 60x, użyto filtra FITC przy czasie naświetlania 850ns w celu wizualizacji autofagosomów/autofagolizosomów oraz filtra DAPI przy czasie naświetlania 90ms do wizualizacji jąder komórkowych.

### **Analiza autofagii za pomocą techniki western blot**

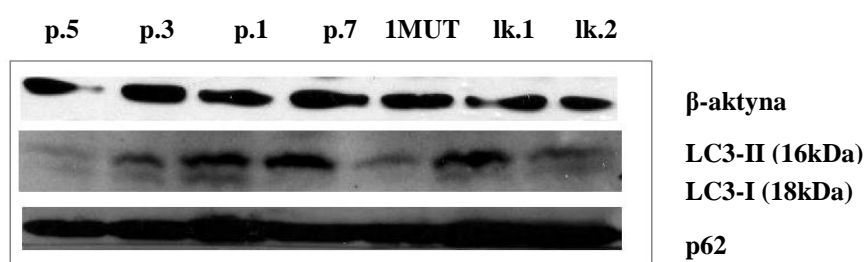
W celu weryfikacji wyników mikroskopowej analizy autofagii wykonano analizę western blot. Oceniono poziom dwóch białek markerowych autofagii - dwie izoformy białka LC3 (LC3-I i LC3-II) oraz białko p62 w liniach komórkowych limfoblastów, fibroblastów i cybryd z dwiema mutacjami LHON oraz w liniach kontrolnych.

Analizy poziomu białek LC3 i p62 w liniach komórkowych limfoblastów, fibroblastów i cybryd z mutacjami LHON oraz kontrolnych przeprowadzono w trzech warunkach hodowli: warunki standardowe - z glukozą oraz w warunkach stresowych - poprzez 24-godziną hodowlę komórek w pożywce z 5mM galaktozą lub 2,5μM rotenonem. Wyniki analiz białek LC3 i p62 w linii fibroblastów weszły również w skład pracy magisterskiej Diany Senator pt.: „Autofagia a apoptoza w dziedzicznej neuropatii nerwu wzrokowego Lebera”, a wyniki analiz tych białek w liniach limfoblastów i cybryd hodowanych z 2,5μM rotenonem weszły także skład pracy magisterskiej Klaudii Karwowskiej pt.: „Odpowiedź komórkowa na stres oksydacyjny w dziedzicznej neuropatii wzrokowej Lebera”. Byłam opiekunem obu wyżej wymienionych prac.

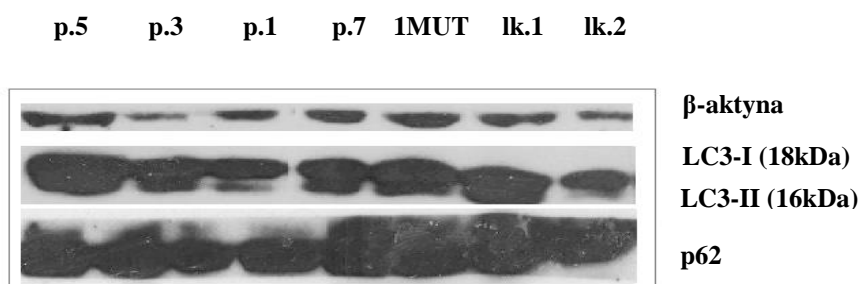
Analizy białek markerowych autofagii wykazały, że stres wywołany hodowlą komórek z 2,5μM rotenonem powodował największą indukcję tego procesu w porównaniu z warunkami standardowej hodowli jak i hodowli z 5mM galaktozą jako głównym źródłem węgla w liniach komórkowych limfoblastów i fibroblastów pacjentów i kontroli. Nie zaobserwowano w tych liniach różnic w poziomie autofagii mierzonej poziomem białka LC3 i p62 między komórkami z mutacjami LHON i kontrolnymi w warunkach hodowli z galaktozą i rotenonem. Wynik te potwierdzają wyżej opisane obserwacje mikroskopowe. Drobne różnice w indukcji autofagii między komórkami z mutacjami LHON zanotowano jedynie w limfoblastach pacjenta p.7 i zdrowej nosicielki m.11778G>A w hodowli z galaktozą, w których nie zanotowano indukcji autofagii, gdyż nie zaobserwowano charakterystycznej izoformy autofagosomalnej białka LC3 (rysunek 41B). Wyniki analizy białek markerowych autofagii w liniach komórkowych limfoblastów i fibroblastów hodowanych w standardowej pożywce oraz z 5mM galaktozą lub 2,5μM rotenonem przedstawiono na rysunkach 41 - 42 A, B i C.

Linie komórkowe limfoblastów

Rysunek 41A.



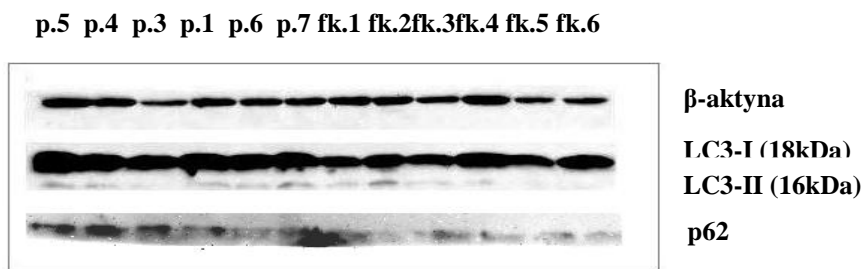
Rysunek 41B.



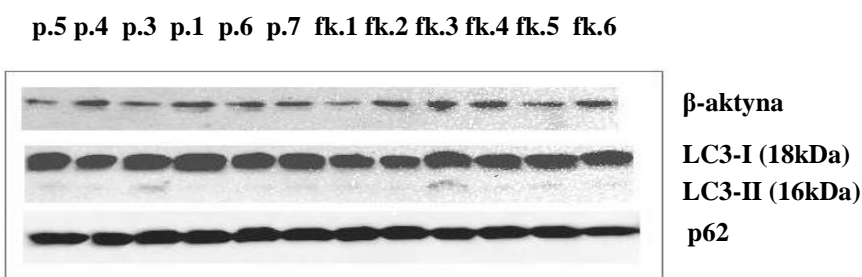
Rysunek. 41C.

**Rysunek 41.** Analiza western blot dla białka p62 i LC3 (izoformy LC3-I i LC3-II) w liniach komórkowych limfoblastów pacjentów z mutacjami LHON i kontrolnych bez mutacji LHON hodowanych w standardowej pożywce z glukozą (A) oraz przez 24 godziny w pożywce z 5mM galaktozą (B) lub w pożywce z 2,5 $\mu$ M rotenonem (C). p.1 - p.7 - limfoblasty pacjentów z dwiema mutacjami LHON (m.11778G>A i m.3460G>A), 1MUT - limfoblasty zdrowej nosicielki m.11778G>A, lk.1, lk.2 - limfoblasty kontrolne bez mutacji LHON.  $\beta$ -aktyna jako kontrola.

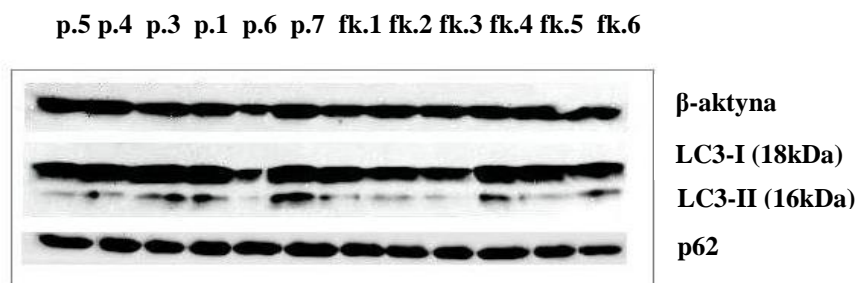


Linie komórkowe fibroblastów

Rysunek 42A.



Rysunek 42B.



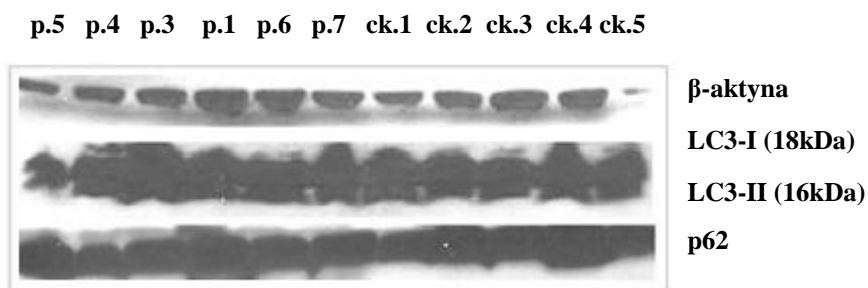
Rysunek 42C.

Rysunek 42. Analiza western blot dla białka p62 i LC3 (izoformy LC3-I i LC3-II) w liniach komórkowych fibroblastów pacjentów z mutacjami LHON i kontrolnych bez mutacji LHON hodowanych w standardowej pożywce z glukozą (A) oraz przez 24 godziny w pożywce z 5mM galaktozą (B) lub w pożywce z 2,5μM rotenonem (C). p.1 - p.7- fibroblasty pacjentów z dwiema mutacjami LHON (m.11778G>A i m.3460G>A), 1MUT - fibroblasty zdrowej nosicielki m.11778G>A, fk.1 - fk.6: fibroblasty kontrolne fibroblastów bez mutacji LHON (fk.1 – fk.3: kontrole męskie, fk.4 - fk.6 – kontrole żeńskie). β-aktyna jako kontrola.

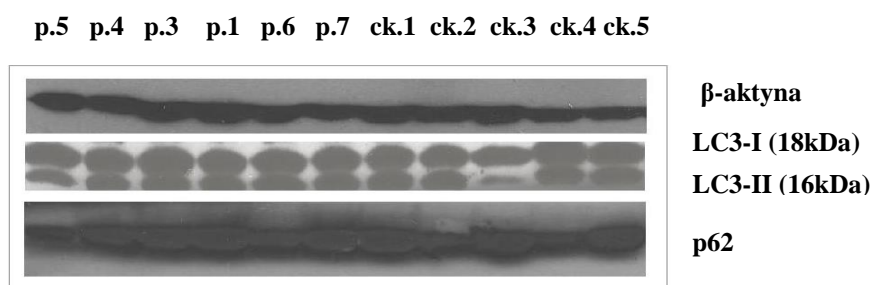
Zazwyczaj hamowanie apoptozy umożliwia zajście autofagii, ponieważ białka autofagii, jak np. Beclin-1, są substratami degradacji przez kaspazy. Jest to szczególnie widoczne w przypadku cybryd hodowanych na galaktozie, gdzie obniżona aktywność kaspaz w liniach p.3, p.4 i p.7 (wykres 11B) korelowała ze zwiększonym gromadzeniem się białka p.62 w stosunku do warunków podstawowych (rysunek 43 A i B), jak również wynik ten zgadzał się z obserwacjami mikroskopowej analizy gromadzenia się autofagosomów, szczególnie dla pacjentów p.4 i p.7 (rysunek 39B).

W komórkach cybryd hodowanych na galaktozie zauważono nieznacznie wyższy poziom białka p62 w liniach p.1, p.3, p.4 i p.7 niż w p.5 i p.6, ale ich poziom nie odbiegał od tego w komórkach kontrolnych (rysunek 43B). W cybrydach hodowanych z rotenonem poziom izoformy autofagosomalnej LC3-II w komórkach cybryd z mutacjami LHON jest wyższy w stosunku do poziomu określonego w komórkach kontrolnych, jednak niższy niż w warunkach hodowli z glukozą, co sugeruje wyhamowanie procesu autofagii w tych warunkach hodowli (rysunki 43A i 43C). Widoczne są jednak w tych warunkach hodowli nieznaczne różnice w poziomie izoformy LC3-II między komórkami z mutacjami LHON, a najwyższy jej poziom występuje w linii p.3 a najniższy w cybrydach linii p.1 i p.6 (rysunek 43C). Poziom p62 dla linii komórkowej cybryd traktowanych 2,5μM rotenonem tak jak dla komórek nietraktowanych jest bardzo wysoki, identyczny we wszystkich komórkach (rysunek 43C).

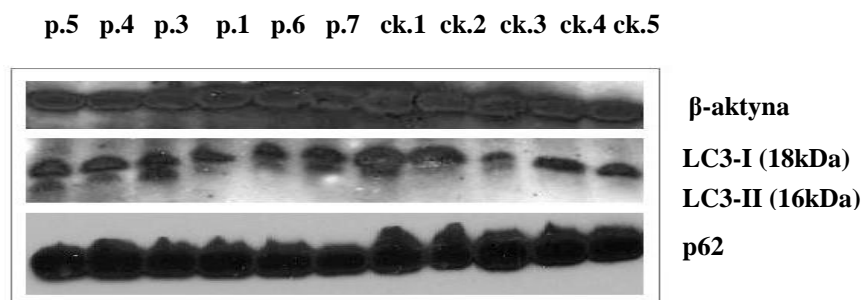
Wyniki analizy białek markerowych autofagii w liniach komórkowych cybryd hodowanych w standardowej pożywce oraz z 5mM galaktozą lub 2,5μM rotenonem przedstawiono na rysunkach 43 A, B i C.

Linie komórkowe cybryd

Rysunek 43A.



Rysunek 43B.



Rysunek 43C.

**Rysunek 43. Analiza western blot dla białka p62 i LC3 (izoformy LC3-I i LC3-II) w liniach komórkowych cybryd z mutacjami LHON i kontrolnych bez mutacji LHON hodowanych w standardowej pożywce (A) oraz przez 24 godziny w pożywce z 5mM galaktozą (B) lub w pożywce z 2,5μM rotenonem (C). p.1 - p.7 - linie komórkowe cybryd z dwiema mutacjami LHON (m.11778G>A i m.3460G>A), ck.1 – ck.5: linie kontrolne cybryd bez mutacji LHON. β-aktyna jako kontrola.**

Na uwagę zasługuje wysoki poziom autofagii we wszystkich warunkach hodowli w cybrydach linii p.3 z wysokim poziomem mutacji m.3460G>A (stopień heteroplazmii wynoszący 89%). Na wysoki poziom autofagii w tych komórkach wskazywała obecność białka markerowego LC3-II we wszystkich warunkach hodowlanych, jak również obserwacje mikroskopowe formowania się autofagosomów. Szczególnie w warunkach hodowli z rotenonem odznacza się nadaktywność autofagii w tej linii komórkowej w stosunku do pozostałych linii z mutacjami LHON. Ponadto w linii tych cybryd w obu warunkach hodowli, z galaktozą i rotenonem, wzrósł formowanie się autofagosomów (rysunek 39B) towarzyszył także spadek aktywności kaspaz (wykresy 11B i 12B).

Odminną sytuację zaobserwowano w cybrydach linii p.6, a także w limfoblastach zdrowej nosicielki m.11778G>A. W limfoblastach zdrowej nosicielki m.11778G>A na galaktozie nie zauważono indukcji autofagii, występowała tylko izoforma cytoplazmatyczna białka LC3 (rysunek 41B), natomiast aktywność kaspaz była znacznie obniżona (wykres 7B). W cybrydach linii p.6 w przeciwieństwie do p.3 przeważa mutacja m.11778G>A (stopień heteroplazmii wynoszący 90%). Obserwacje mikroskopowe formowania się autofagosomów w cybrydach tej linii nie wykazały istotnych zmian między warunkami hodowli na glukozie i galaktozie, natomiast w warunkach hodowli na rotenonie zaobserwowano znacznie obniżony poziom autofagosomów (rysunek 39B). Analizy białek markerowych autofagii w tej linii potwierdziły obserwacje mikroskopowe, ponieważ najniższy poziom autofagosomalnej izoformy białka LC3 zaobserwowano w warunkach hodowli z rotenonem (rysunek 43 A, B i C). Ponadto w warunkach hodowli z rotenonem niski poziom białka LC3-II w linii p.6 był skorelowany ze spadkiem aktywności kaspaz (wykres 12B). Otrzymane wyniki mogą wskazywać, że w tych dwóch liniach komórkowych, limfoblastach zdrowej nosicielki m.11778G>A i w linii cybryd p.6, mimo zaistnienia korzystnych warunków do aktywacji autofagii, jakimi było zmniejszenie aktywności kaspaz, nie została ona zaindukowana w stopniu porównywalnym do reszty linii komórkowych z mutacjami LHON i osób z grupy kontrolnej.

Wyżej wymienione wyniki sugerują, że w komórkach cybryd występują dwie skrajne sytuacje - niska aktywność autofagii w warunkach stresowych w linii cybryd z bliskim homoplazmii poziomem m.11778G>A (linia p.6) lub wzmożona aktywność autofagii w warunkach stresowych w porównaniu do reszty komórek cybryd z mutacjami LHON i kontrolnych w linii cybryd z bliskim homoplazmii poziomem m.3460G>A (linia p.3).

Otrzymane w ramach analizy western blot wyniki wskazują, że istnieje różnica między liniami komórkowymi w poziomie autofagii podstawowej. W warunkach standardowej hodowli w liniach limfoblastów występuje tylko cytoplazmatyczna izoforma białka LC3 (rysunek 41A), natomiast w fibroblastach i cybrydach można było również zaobserwować izoformę II, świadczącą o aktywacji autofagii, przy czym jej poziom był wyższy w cybrydach w porównaniu do fibroblastów (rysunek 42 A i 43A).

W wyniku przeprowadzonych analiz na trzech typach linii komórkowych nie zaobserwowano różnic w intensywności zachodzenia autofagii między komórkami z mutacjami LHON a kontrolnymi w różnych warunkach hodowli. Jednak w komórkach limfoblastów i cybryd zauważono pojedyncze wyjątki od tej obserwacji. Zauważono, że w zależności od tego, czy w komórkach był bliski homoplazmii poziom m.3460G>A czy przeważała m.11778G>A autofagia była lekko podwyższona lub zachodziła na nieco niższym poziomie w stosunku do reszty komórek kontrolnych i o niższym poziomie heteroplazmii obu mutacji.

## 5. DYSKUSJA

### 5.1 Ocena zastosowanych linii komórkowych do analizy wpływu mutacji mitochondrialnych na metabolizm komórkowy

Z racji rodzaju tkanki, w której występują zaburzenia wynikające z mutacji m.11778G>A i m.3460G>A przyczyniających się do rozwoju LHON, bardzo trudno jest uzyskać materiał do badań w postaci komórek zwojowych siatkówki, a wnioski można opierać głównie na wynikach badań innych tkanek pobranych od nosicieli mutacji. Z tego powodu przyczyn degeneracji nerwu wzrokowego należy szukać w różnicach w metabolizmie różnych komórek ciała pacjentów z mutacjami LHON w stosunku do zdrowych osób, jak również w zróżnicowanej wrażliwości na czynniki stresowe oraz mechanizmie odpowiedzi na te czynniki.

W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono trzy modele komórkowe do oceny wpływu mutacji mitochondrialnych przyczyniających się do rozwoju LHON: linię komórkową limfoblastów, fibroblastów i hybryd transmitochondrialnych (cybryd).

Niewątpliwą wadą modelu komórkowego linii limfoblastów jest konieczność pracy z wirusem Epsteina-Barr. Jednak dużą zaletą tego modelu jest łatwość uzyskania materiału do hodowli, ponieważ pobranie krwi nie jest wysoce inwazyjnym i bolesnym zabiegiem, a ponadto unieśmiertelnienie hodowli umożliwia nieograniczony dostęp do materiału badawczego. Choć procedura unieśmiertelniania limfocytów B jest dość długa, warto wykorzystać ten model jeśli zajdzie potrzeba wielokrotnych eksperymentów, które wymagają dużej ilości materiału badawczego.

Linie komórkowe fibroblastów trudniej uzyskać niż limfoblastów, gdyż wymagają pobrania bioptatu skóry, a procedura ta stanowi większą ingerencję w ciało i jest bardziej bolesna oraz wymaga większej sterylności i zaangażowania większej liczby osób, a nie każdy pacjent wyraża zgodę na taki zabieg. Jednocześnie skóra ludzka jest bardziej zanieczyszczona i zawiera wiele różnych bakterii, które mogą spowodować zakażenia wczesnej hodowli fibroblastów i utratę linii komórkowej. Ponadto ze względu na ograniczoną liczbę podziałów komórkowych, fibroblasty ograniczają czasowo i ilościowo procedury badawcze.

Oba modele, limfoblasty i fibroblasty, umożliwiają obserwowanie tego co dzieje się w komórce z mutacjami LHON wraz z tłem jądrowym pacjenta. Jednak tło jądrowe może

modyfikować metabolizm komórkowy wynikający z mutacji mitochondrialnych i maskować ich prawdziwy wpływ na funkcjonowanie komórki. Wyeliminowanie wpływu tła jądrowego i możliwość obserwacji faktycznego wpływu mutacji mitochondrialnych na funkcjonowania komórki zapewniają cybrydy.

Zastosowanie w niniejszej pracy modelu cybrydowego umożliwiło zidentyfikowanie zaburzeń, które były mniej dostrzegalne w komórkach z tłem jądrowym pacjentów, jak choćby zwiększenie wydolności oddechowej, określenie poziomu heteroplazmii, który jest neutralny oraz progę, który wzmacnia produkcję wolnych rodników czy subtelne zmiany w indukcji autofagii. Jednak i ten model nie jest pozbawiony wad. Jedną z nich jest wykorzystanie w procedurze cybrydyzacji komórek rho0 posiadających niestabilne, nowotworowe tło jądrowe. Ponadto podczas procedury cybrydyzacji, która jest wieloetapowa i stanowi duże źródło stresu komórkowego, może dochodzić do różnych zmian chociażby w ekspresji genów, których można nie wychwycić podczas analiz. Procedura cybrydyzacji jest również czasochłonna, wymaga wcześniejszej enukleacji fibroblastów, uzyskania lub zakupu linii komórkowej rho0, a później długotrwałej selekcji jak również kilkukrotnego sprawdzenia poprawności cybrydyzacji poprzez określenie zgodności tła jądrowego cybryd z komórkami rho0 oraz sprawdzenia obecności mtDNA i badanych mutacji w cybrydach.

Żaden z powyżej opisanych modeli komórkowych nie jest idealny, jednak każdy z nich dostarcza pewnych informacji, których połączenie pozwala na wyciąganie wniosków na temat zaburzeń metabolicznych wywołanych mutacjami LHON.

Każda komórka ciała osoby z LHON posiada mutacje mitochondrialne, z mniejszym lub większym poziomem heteroplazmii, ale obserwowany u badanych pacjentów wysoki poziom mutacji w fibroblastach skóry nie przekłada się na problemy w tej tkance. Ekspresja choroby ograniczona jedynie do degeneracji nerwu wzrokowego sugeruje, że to nie tylko obecność mutacji zaważa na procesie degeneracyjnym, ale różnice w metabolizmie różnych komórek. Jeśli mutacje wpływałyby jednakowo na wszystkie typy komórek, wtedy w LHON, tak jak w przypadku innych chorób mitochondrialnych, powinno obserwować się objawy ze strony wielu różnych układów ciała, a nie tylko nerwu wzrokowego. Nadzieje na uzyskanie lepszych modeli LHON można upatrywać w indukowanych komórkach pluripotencjalnych oraz zwierzęcych modelach choroby. Choć trudno uzyskać model zwierzęcy choroby, wiele grup badawczych pracuje nad jego stworzeniem z pewnymi sukcesami na myszach (Lin i wsp., 2012). Wiarygodny model zwierzęcy byłby wielkim ułatwieniem i umożliwiałby sprawdzenie i porównanie, czy obserwowane zmiany

metaboliczne w modelach komórkowych przekładają się na to co rzeczywiście dzieje się w komórkach zwojowych siatkówki.

## 5.2 Rzadkie mutacje mitochondrialne odpowiedzialne za wystąpienie LHON

Podczas analiz materiału genetycznego wyizolowanego z krwi probandów z utratą wzroku spowodowaną śmiercią komórek zwojowych siatkówki oraz członków ich rodzin, u których wykluczono obecność podstawowych mutacji odpowiedzialnych za LHON, udało się zidentyfikować dwie rzadkie mutacje mitochondrialne: m.3635G>A w genie *ND1* oraz m.13042G>A w genie *ND5*.

Pierwsza zidentyfikowana mutacja m.3635G>A powoduje zmianę konserwowanej ewolucyjnie seryny na asparaginę w kodonie 110 (S110N) podjednostki *ND1* I kompleksu łańcucha oddechowego. Zmiana S110N, mimo iż skutkuje zamianą jednego aminokwasu hydrofilowego na inny hydrofilowy, powoduje redukcję hydrofobowości tego polipeptydu (Zhang i wsp., 2009). Mutacja m.3635G>A wcześniej została już zidentyfikowana u rosyjskiej rodziny z LHON (Brown i wsp., 2001) oraz 7 chińskich rodzin z wywiadem rodzinnym LHON oraz u 4 chińskich pacjentów bez wywiadu rodzinnego powiązanego z tą chorobą (Jia i wsp., 2010; Yang i wsp., 2009; Zhang i wsp., 2009). Tylko u jednego z wcześniej opisanych pacjentów LHON zidentyfikowano mutację w formie heteroplazmatycznej, w pozostałych przypadkach mutacja ta występowała w formie homoplazmatycznej (Jia i wsp., 2010). U probanda z polskiej rodziny w Instytucie Genetyki i Biotechnologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego (IGIB) wykryto tę mutację w formie homoplazmatycznej, natomiast u jego matki i kuzyna m.3635G>A występowała w formie heteroplazmatycznej. Mimo iż matka probanda miała we krwi wyższy poziom mutacji niż chory kuzyn probanda, nie wystąpił u niej zanik nerwu wzrokowego, co potwierdza regułę dotyczącą LHON, że płeć żeńska w tej chorobie stanowi czynnik ochronny.

Proband z rodziny rosyjskiej z LHON z m.3635G>A należał do haplogrupy J (Brown i wsp., 2001) podobnie jak pacjenci z polskiej rodziny z tą mutacją analizowani w ramach niniejszej pracy. Badania asocjacyjne między haplogrupami a mutacjami w mtDNA u pacjentów z LHON wykazują, że w Ameryce Północnej i Europie mutacja m.11778G>A występuje od trzech do sześciu razy częściej na tle haplogrupy J, co sugeruje, że polimorfizmy definiujące tę haplogrupę zwiększają penetrację tej mutacji (Brown i wsp.,



2001). Nie można jednak na podstawie dwóch przypadków mutacji m.3635G>A wyciągnąć wniosku, że również ta mutacja występuje częściej na tle haplogrupy J, gdyż zbyt mała częstość jej występowania jest niewystarczająca do wykonania badań asocjacyjnych, można jedynie mniemać, że jeśli polimorfizmy tej haplogrupy wpływają w jakiś sposób na ekspresję fenotypową jednej z podstawowych mutacji LHON, to również mogą zaostrzać fenotyp pacjentów z mutacją m.3635G>A.

Analizy biochemiczne przeprowadzone przez Brown i wsp. (2001) na limfoblastach i cybrydach od pacjenta z m.3635G>A wykazały, że powoduje ona dysfunkcje oddechowe komórek powiązane z kompleksem I. Ze względu na niedostępność materiału biologicznego od analizowanych pacjentów w ramach niniejszej pracy nie przeprowadzono analogicznych analiz biochemicznych i nie można potwierdzić tych wyników. Pojawienie się pierwszych objawów choroby między 14-34 rokiem życia u chińskich pacjentów z LHON z tą mutacją (Yang i wsp., 2009) jak i u pacjentów z rodziny rosyjskiej (Brown i wsp., 2001) pokrywa się z wiekiem zachorowania pacjenta analizowanego w tej pracy, i jest to okres życia, w którym zazwyczaj pojawiają się objawy choroby.

Następną zidentyfikowaną zmianą u innego probanda z drugiej z analizowanych w ramach niniejszej pracy rodzin była mutacja m.13042G>A. Pacjent z m.13042G>A, którego analizy genetyczne opisano w niniejszej pracy, jest czwartym opisywanym przypadkiem powiązania tej zmiany w genie *ND5* z chorobami o podłożu neurologicznym. Dane literaturowe oraz zawarte w bazie MITOMAP wskazują na korelację między mutacjami w tym największym z genów kodowanych przez mtDNA (1811pz) a występowaniem u ich nosicieli objawów z pogranicza zespołów MELAS/MERRF/Leigha, czyniąc z genu *ND5* tzw. „gorące miejsce” mutacji dla tych chorób (Blok i wsp., 2007).

m.13042G>A została wcześniej opisana w trzech przypadkach: u pacjentów z klinicznymi cechami zespołu MELAS i zespołu MERRF (Naini i wp., 2005), w przypadku zespołu LHON-plus (zanik nerwu wzrokowego z towarzyszącymi migrenami, drgawkami, udarami, kataraktą i retinopatią) (Valentino i wsp., 2006) oraz zespołu przypominającego zespół Leigha (Blok i wsp., 2007). Proband, którego DNA analizowano w niniejszej pracy zachorował niemal w identycznym wieku (22 lata) i wykazywał poza zanikiem nerwu wzrokowego podobne zaburzenia neurologiczne (mioklonie i drgawki) do tych opisanych przez Naini i wsp. (2005) u 20 letniego pacjenta z tą mutacją.

Przeprowadzona analiza genetyczna wskazała, że m.13042G>A występowała w mtDNA wszystkich zanalizowanych tkanek probanda, ale nie w tkankach jego matki.

Ze względu na ostrość objawów fenotypowych obserwowanych u nosicieli m.13042G>A mało prawdopodobne jest, aby mutacja była dziedziczona wcześniej w rodzinie, ponieważ matka probanda ma również trzech zdrowych, dorosłych braci. Jednak ze względu na specyficzność tej choroby, która występuje tylko u 50% męskich nosicieli oraz identyfikację m.13042G>A u jej nosicieli bez zdiagnozowanego zaniku nerwu wzrokowego (Valentino i wsp., 2006) nie można wykluczyć nosicielstwa także u nich. Zazwyczaj w chorobach mitochondrialnych mutacje występują na zmiennym poziomie w różnych tkankach nosiciela, dlatego brak stwierdzenia mutacji we wszystkich trzech analizowanych tkankach matki probanda oraz brak innych chorych spokrewnionych z nią w linii żeńskiej, przemawia za hipotezą, że mutacja ta nie występowała wcześniej w tej rodzinie i powstała *de novo* u probanda albo *de novo* w linii komórek płciowych jego matki. Nie dysponowano materiałem genetycznym od pozostałych synów matki probanda i niewiadomo czy są oni również nosicielami mutacji, co umożliwiłoby określenie statusu nosicielstwa matki probanda.

We włoskiej rodzinie z LHON zanik nerwu wzrokowego powiązany z identyfikacją m.13042G>A zdiagnozowano również u kobiet (Valentino i wsp., 2006), co jest niezwykle rzadkim zjawiskiem, i może przemawiać za dużym wpływem tej mutacji na metabolizm komórek. Tranzycja guaniny na adeninę w pozycji 13042 mtDNA spowodowana mutacją powoduje zastąpienie alaniny treoniną w kodonie 236 podjednostki ND5 (A236T). Kodon ten jest silnie konserwowany u różnych gatunków. W przypadku substytucji A236T obserwuje się zamianę małego aminokwasu hydrofobowego na średniej wielkości hydrofilowy podobnie jak w przypadku jednej z podstawowych mutacji LHON m.3460G>A/ND1 (A52T), co jak wykazują badania Zhanga i wsp. (2009) znacznie zwiększa hydrofilowość domeny proksymalnej tego białka. Białko ND5 jest hydrofobowym polipeptydem zlokalizowanym peryferyjnie w kompleksie I łańcucha oddechowego (Blok i wsp., 2007). Zważywszy na jego hydrofobowość, substytucja aminokwasu hydrofobowego hydrofilowym mogłaby spowodować zaburzenia interakcji hydrofobowo-hydrofilowych i wpłynąć na zmianę pozycji przestrzennej aminokwasów w polipeptydzie i pośrednio na lokalną konformację białka i sposób jego fałdowania, co w konsekwencji mogłoby prowadzić do zaburzeń jego funkcjonowania (Joshi, 2013). Ponadto analiza na ekstraktach mięśniowych od pacjenta z tą mutacją (przeprowadzona przez Naini i wsp., 2005) wykazała znaczne obniżenie aktywności kompleksu I.

Wszystkie cechy jakie są powiązane ze zidentyfikowanymi u badanych probandów

mutacjami m.3635G>A i m.13042G>A, opisywanymi w ramach niniejszej pracy, jak kosegregacja mutacji z chorobą, brak tych tranzycji w materiale genetycznym dużej liczby zdrowych osób (baza danych mtDB i MITOMAP), zamiana wysoce konserwowanego ewolucyjnie aminokwasu, wpływ na hydrofobowość danego fragmentu białka, występowanie tych mutacji u niespokrewnionych rodzin z LHON jak i u innych pacjentów z różnymi zaburzeniami neurologicznymi (dla mutacji m.13042G>A) oraz doniesienia literaturowe dotyczące negatywnego wpływu tych tranzycji na funkcjonowanie łańcucha oddechowego potwierdzają ich patogenność, zatem mogą być również przyczyną wystąpienia LHON, a ponadto przemawiają za tym, żeby analiza w kierunku detekcji tych zmian została włączona do diagnostyki LHON u pacjentów z wykluczonymi mutacjami podstawowymi. Jedyną cechą, jaka wykluczałaby m.3635G>A z grupy mutacji patogennych jest obecność tej zmiany na wysokim poziomie (72%) u zdrowej nosicielki, jednakże niska penetracja mutacji odpowiedzialnych za LHON u kobiet jest cechą charakterystyczną tej choroby, zatem ekspresja fenotypowa w przypadku niektórych wariantów tylko u części ich nosicieli, a brak u innych nie powinno wykluczać tych wariantów jako potencjalnie patogennych (Wallis i wsp., 2013).

Mutacje w genie *ND5* są częstą przyczyną dysfunkcji łańcucha oddechowego. Mnogość objawów, które występują u nosicieli mutacji w tym genie sugeruje, że w momencie rozpoznania u pacjenta zaniku nerwu wzrokowego z towarzyszącymi zaburzeniami neurologicznymi, u którego wykluczy się mutacje podstawowe odpowiedzialne za LHON, jeśli nie jest możliwe zsekwenjonowanie całego genomu mitochondrialnego, wtedy w pierwszej kolejności sekwencjonować gen *ND5* mtDNA.

### **5.3 Analiza poziomu heteroplazmii mutacji mitochondrialnych w różnych typach komórek pacjentów z zanikiem nerwu wzrokowego**

Przeprowadzona w ramach niniejszej pracy analiza poziomu heteroplazmii różnych mutacji w komórkach pacjentów z LHON (pacjenci z dwiema mutacjami m.11778G>A i m.3460G>A oraz pacjent z m.13042G>A) wykazała znaczące różnice w poziomie heteroplazmii mutacji między różnymi komórkami ciała tego samego pacjenta jak również w komórkach tej samej tkanki między osobami z jednej rodziny (komórki krwi pacjentów z rodziny z mutacją m.3635G>A oraz komórki krwi i fibroblastów z rodziny z dwiema

mutacjami LHON), co jest cechą charakterystyczną wszystkich chorób mitochondrialnych, u których podstaw leżą mutacje w mtDNA, i jest to spowodowane losową segregacją mitochondriów do komórek potomnych.

Dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera jest specyficzną chorobą mitochondrialną, ograniczoną tylko do nerwu wzrokowego, a obecność mutacji w zdecydowanej większości przypadków nie objawia się fenotypowo w innych tkankach ciała chorych. Potwierdzają to także wyniki uzyskane w niniejszej pracy. Warto zwrócić uwagę, że poziom m.11778G>A, najczęstszej mutacji odpowiedzialnej za rozwój LHON, we wszystkich badanych w niniejszej pracy typach komórek pacjentów u wszystkich pacjentów z analizowanej rodziny (komórki krwi, limfoblastów i fibroblastów) jest bardzo wysoki (poziom mutacji mieści się w zakresie 95-99%). Jednocześnie są to komórki z tkanek ciała nie objętych stanem chorobowym, co oznacza, że nawet wysoki poziom mutacji nie jest patogenny dla tych typów komórek. Otrzymane wyniki wraz ze stwierdzonym przez lekarzy brakiem u badanych pacjentów innych objawów fenotypowych poza utratą wzroku potwierdzają wyniki obserwacji klinicznych, że mutacje odpowiedzialne za LHON mogą osiągać wysoki poziom w różnych tkankach ciała, ale z bliżej nieokreślonych przyczyn są patogenne jedynie dla nerwu wzrokowego.

W trakcie wykonywania niniejszej pracy doktorskiej zaistniała możliwość sprawdzenia, czy w komórkach krwi pacjentów z dwiema mutacjami LHON (m.11778G>A oraz m.3460G>A), mutacje te utrzymują się na stałym poziomie czy może dochodzi do eliminacji któregoś wariantu. Ghosh i wsp. (1996) badając krew 8 pacjentów z m.3460G>A zanotowali, że poziom mutacji pozostaje stały przez około 3,5 roku i doszli do wniosku, że jest to okres zbyt krótki aby zauważyć istotne zmiany i zaobserwować wpływ selekcji przeciwko tej mutacji. Podobną sytuację zaobserwowano w przypadku analizowanych w ramach niniejszej pracy próbek krwi. Czteroletnia przerwa między badaniami nie pozwoliła na wykrycie istotnych statystycznie różnic i nie umożliwiła określenie czy dochodzi do selekcji negatywnej którejś z mutacji. Wysoki poziom m.11778G>A w komórkach krwi sugeruje, że nie wywołuje ona istotnych zmian dla ich metabolizmu, o czym może również świadczyć fakt, że w LHON nie stwierdza się objawów dysfunkcji układu krwiotwórczego i nie powinno oczekiwać się presji selekcyjnej przeciwko jej obecności w tej tkance, tak jak to wykazano w przypadku komórek krwi pacjentów analizowanych w niniejszej pracy.

## 5.4 Stres oksydacyjny w komórkach z mutacjami LHON

Nadmierna produkcja wolnych rodników tlenowych oraz związany z tym wysoki poziom stresu oksydacyjnego jest jedną z najczęściej postulowanych przyczyn rozwoju LHON. Teoria ta jest także wspierana faktem, że mitochondrialny łańcuch oddechowy jest głównym źródłem wolnych rodników w komórce, a mutacje powodujące dysfunkcję łańcucha oddechowego mogłyby dodatkowo wpływać na wzrost ich produkcji.

Analiza mikroskopowa produkcji reaktywnych form tlenu przeprowadzona w ramach niniejszej pracy wykazała, że w normalnych warunkach hodowli komórki fibroblastów i cybryd z mutacjami m.11778G>A i m.3460G>A wykazują wysoki poziom stresu oksydacyjnego, wyższy niż w komórkach kontrolnych bez mutacji w mtDNA. Taki wynik wspiera teorię o zaangażowaniu wzmożonego stresu oksydacyjnego w patofizjologię komórek z mutacjami m.11778G>A oraz m.3460G>A.

Ponadto, analizy na cybrydach wykazały, że intensywność produkcji ROS w komórkach jest uzależniona od poziomu mutacji LHON. Najniższy poziom stresu oksydacyjnego zaobserwowano w komórkach z poziomem mutacji m.11778G>A nie przekraczającym 45% i m.3460G>A nie przekraczającym 13%. Dopiero hodowla tych komórek z rotenonem skutkowała gwałtownym wzrostem produkcji ROS. W pozostałych liniach o wyższym poziomie heteroplazmii m.11778G>A i m.3460G>A hodowla z rotenonem nie wpłynęła w znacznym stopniu na produkcję ROS, a poziom stresu oksydacyjnego w tych komórkach był porównywalnie wysoki zarówno przed jak i po dodaniu tego odczynnika. Obserwacje te wskazują, że dopiero przekroczenie pewnego progu mutacji powoduje efekt fenotypowy, jakim w tym przypadku jest wzmożona produkcja ROS.

Obserwowany, podwyższony poziom ROS w komórkach fibroblastów i cybryd z mutacjami LHON analizowanych w niniejszej pracy, może wynikać z zakłóconej interakcji między kompleksem I i ubichinonem, co sugerowano w literaturze już wcześniej (Ghelli i wsp., 2009). Taka sytuacja zaburzałaby przepływ elektronów z kompleksu I na ubichinon i kolejne przenośniki, co skutkowałoby ich bezpośrednim transportem na tlen z wytworzeniem anionorodników nadadtlenkowych. Za takim mechanizmem powstania stresu oksydacyjnego w komórkach z mutacjami LHON mogą przemawiać wyniki analiz produkcji ROS przeprowadzone w ramach niniejszej pracy, ponieważ porównania między intensywnością fluorescencji dla wszystkich reaktywnych form tlenu z tą wywołaną przez

$o_2^-$ , wskazują, że w analizowanych komórkach właśnie  $o_2^-$  jest przeważającą reaktywną formą tlenu.

Za zablokowaniem przepływu elektronów z kompleksu I w wyniku mutacji mitochondrialnych w LHON mogą także przemawiać wyniki badań klinicznych z lekiem o nazwie idebenon, który poprawia jakość widzenia u niektórych chorych na LHON (Sadun i wsp., 2011; Klopstock i wsp., 2011), a którego działanie polega na uruchomieniu przepływu elektronów bezpośrednio na kompleks III z ominięciem kompleksu I (Haefeli i wsp., 2011). Skuteczność tego leku u niektórych pacjentów sugeruje, że potencjalny problem, czyli dysfunkcja transportu elektronów przez kompleks I został ominięty, jednak brak pozytywnej reakcji ze strony wszystkich pacjentów z mutacjami LHON wskazuje na istotny udział dodatkowych czynników wpływających na zaburzenia metabolizmu i śmierć komórek w LHON. Możliwe także, że skuteczność tego leku jest także uzależniona od stadium choroby.

### **5.5 Analiza wpływu zmiennego poziomu mutacji mitochondrialnych i specyficzności komórkowej na zdolność rotenonu do hamowania oksydoreduktazy NADH-Q**

Przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy badania produkcji wolnych rodników tlenowych wykazały, że fibroblasty pacjentów z dwiema mutacjami LHON m.11778G>A i m.3460G>A są odporne na działanie inhibitora oksydoreduktazy NADH-Q, rotenonu. 24-godzinna hodowla z tym inhibitorem spowodowała wzmożoną produkcję reaktywnych form tlenu i śmierć komórek fibroblastów osób z grupy kontrolnej, natomiast wszystkie linie fibroblastów zawierające mutacje LHON nie wykazywały zwiększonej produkcji ROS ani istotnego statystycznie wzrostu fragmentacji DNA w stosunku do warunków przed dodaniem rotenonu. Zakładano, że przy tak silnej inhibicji kompleksu I łańcucha oddechowego, jaką powoduje rotenon, komórki z mutacjami będą wchodziły na ścieżkę śmierci komórkowej szybciej niż kontrole z racji dysfunkcji kompleksu I, natomiast wyniki eksperymentu wykazały sytuację zupełnie odwrotną, a ponadto dotyczyły wszystkich linii fibroblastów pacjentów z LHON bez wyjątku.

Otrzymane wyniki mogą być spowodowane opisywaną już wcześniej w literaturze obniżoną zdolnością do wiązania rotenonu w obecności mutacji m.11778G>A i m.3460G>A (Lenaz i wsp., 2004). Obniżoną wrażliwość na działanie rotenonu w tych komórkach



tłumaczy się zmianami konformacyjnymi miejsca wiązania rotenonu w wyniku tych mutacji uniemożliwiający efektywne łącznie się rotenonu do kompleksu I.

Dane literaturowe dotyczące analiz płytek krwi pacjentów z LHON wykazują obniżoną zdolność do wiązania rotenonu, która była uzależniona od rodzaju i poziomu mutacji. Mniejszą wrażliwość na hamujące działanie rotenonu wykazywały komórki z m.11778G>A występującą w formie homoplazmatycznej oraz m.3460G>A w formie zarówno homoplazmatycznej i heteroplazmatycznej w stosunku do komórek kontrolnych, natomiast dla m.11778G>A w formie heteroplazmatycznej wrażliwość na rotenon była porównywalna z kontrolami (Ghelli i wsp., 1997). Analizy przeprowadzone w ramach niniejszej pracy tylko częściowo potwierdzają te wyniki.

Na suplementację pożywki rotenonem komórki cybryd zareagowały wzmożoną produkcją ROS oraz uruchomieniem w niektórych z nich apoptozy lub nekrozy. Te efekty były widoczne w komórkach cybryd kontrolnych oraz tych, które miały najniższy stopień heteroplazmii obu mutacji, chociaż fragmentację DNA zauważono również w linii o poziomie heteroplazmii m.11778G>A bliskim 90%. Oznacza to, że tak jak to wcześniej stwierdzono w płytkach krwi (Ghelli i wsp., 1997) tak i w cybrydach obecność m.11778G>A w stanie heteroplazmatycznym nie obniża zdolności wiązania rotenonu i komórki z tą mutacją w stanie heteroplazmatycznym wiążą rotenon z taką wydajnością jak komórki kontrolne bez mutacji.

Wszystkie komórki fibroblastów pacjentów, które były niewrażliwe na działanie rotenonu wykazywały poziom heteroplazmii m.11778G>A przekraczający 95%, co sugeruje, że przekroczenie tego poziomu m.11778G>A w fibroblastach jest wystarczające do ich uniewrażliwienia na rotenon. Poziom mutacji powyżej 95% jest bliski homoplazmii, dlatego można uznać, że wyniki te pokrywają się z tymi otrzymanymi dla płytek krwi przez Ghelli i wsp. (1997).

Odmierna sytuacja występuje w przypadku mutacji m.3460G>A. Suplementacja rotenonem hodowli cybryd z m.3460G>A w stanie heteroplazmatycznym, wynoszącym  $36,6\% \pm 0,6$  lub  $89,3\% \pm 0,6$  powodowała zwiększenie poziomu apoptozy, co przemawia za tym, że nadal efektywnie wiązały ten inhibitor i jest to sprzeczne z wynikami dla płytek krwi otrzymanymi przez Ghelli i wsp. (1997), w których mutacja zarówno w stanie homoplazmii jak i heteroplazmii obniżała zdolność wiązania rotenonu.

Uzyskane wyniki dla różnych linii komórkowych sugerują, że uniewrażliwienie się na działanie rotenonu w komórkach z mutacjami LHON jest uzależnione od rodzaju mutacji, jej

poziomu, a także od typu komórki. W wiązanie rotenonu do kompleksu I może być zaangażowany szereg podjednostek kompleksu I i różny stopień mutacji genów je kodujących może przekładać się na zmienny obraz wrażliwości na rotenon.

## **5.6 Mechanizmy kompensacyjne produkcji ATP w różnych komórkach z mutacjami LHON**

Cechą charakterystyczną LHON jest niepełna penetracja tej choroby. Fakt, że choroba nie występuje u wszystkich nosicieli mutacji sugeruje jakiś mechanizm modyfikujący jej ekspresję bądź niwelujący skutki mutacji, dlatego wiele badań skupia się obecnie na poszukiwaniu mechanizmów, które modulują ekspresję choroby. Postuluje się, że zdrowi nosiciele mutacji LHON mogą mieć rozwinięte mechanizmy kompensujące produkcję ATP, jeśli produkcja z łańcucha oddechowego jest niewystarczająca.

W trakcie wykonywania eksperymentów na różnych liniach komórkowych z mutacjami LHON zauważono dwa mechanizmy metaboliczne, które mogą przyczyniać się do zwiększenia produkcji ATP, mianowicie wzmoczoną glikolizę i wyższe tempo oddychania komórkowego, w liniach cybryd połączone ze zwiększoną wydolnością oddechową. Mechanizmy te były zróżnicowane komórkowo, a ich uruchomienie było uzależnione od rodzaju i poziomu mutacji LHON.

Detekcji wzmoczonej glikolizy udało się dokonać dzięki analizom poziomu apoptozy w hodowli na galaktozie. Zwiększoną fragmentację DNA w tych warunkach, zmuszających komórki do produkcji ATP wyłącznie na zasadzie fosforylacji oksydacyjnej, zaobserwowano w dwóch liniach limfoblastów zdrowych nosicielek mutacji LHON oraz w jednej linii cybryd. Apoptoza w hodowli na galaktozie oznaczała, że komórki w tych warunkach nie były zdolne do produkcji odpowiedniej ilości energii do podtrzymania wszystkich procesów życiowych. Oznacza to także, że braki energetyczne związane z fosforylacją oksydacyjną były w nich kompensowane poprzez produkcję ATP z wykorzystaniem glukozy w tzw. procesie przełączenia się na glikolizę (ang. „*glycolytic switch*” lub „*metabolic switch*”) (Ramanujan, 2014).

Jednocześnie hodowla tych samych komórek limfoblastów z inhibitorem kompleksu I także wykazała indukcję apoptozy. Może to oznaczać, że wzmoczona glikoliza pomaga zrekompensować deficyty energetyczne wywołane dysfunkcją łańcucha oddechowego, ale jako samodzielny proces nie umożliwia wyprodukowania odpowiedniej ilości ATP do



utrzymania metabolizmu komórkowego i nie jest w stanie w pełni zastąpić fosforylacji oksydacyjnej. Hipotezę tę mogą wspierać, podobne wyniki analiz komórek pacjentów z chorobą Alzheimera (Hedskog i wsp., 2012), gdzie przełączenie się komórek nerwowych na glikolizę tylko opóźniało, ale nie zapobiegało późniejszej śmierci neuronów. Ponadto badania myszy wykazują, że wyciszenie genu mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego (Tfam) skutkuje zainicjowaniem postępującej neurodegeneracji i śmierci w odstępie pół roku od zapoczątkowania eksperymentu, co udowadnia, że neurony z dysfunkcyjnymi mitochondriami mogą przeżyć jedynie krótki okres czasu (Hedskog i wsp., 2012). Śmierć komórek nerwowych po zahamowaniu fosforylacji oksydacyjnej potwierdza fakt, że są one w dużym stopniu uzależnione od tej ścieżki produkcji energii, i nawet wzmożona glikoliza nie jest zdolna do pełnego pokrycia ich zapotrzebowań energetycznych, dlatego nie wydaje się także, aby komórki nerwu wzrokowego mogły wykorzystać glikolizę jako alternatywną ścieżkę produkcji ATP.

Drugim systemem, potencjalnie przydatnym w kompensowaniu skutków zaburzonej produkcji ATP z fosforylacji oksydacyjnej, zidentyfikowanym w analizowanych komórkach z mutacjami LHON, było podwyższone tempo oddychania w liniach komórkowych fibroblastów i cybryd z mutacjami LHON.

Ciekawe jest, że tylko w liniach fibroblastów męskich pacjentów z LHON zauważono podwyższone tempo oddychania w stosunku do komórek kontrolnych, natomiast w jednej linii zdrowej nosicielki mutacji LHON tempo oddychania było porównywalne z komórkami kontrolnymi, natomiast wszystkie linie fibroblastów z mutacjami LHON miały zbliżoną do komórek kontrolnych wydolność oddechową. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że podwyższone tempo oddychania komórek z mutacjami może wynikać ze zwiększonej liczby kopii mtDNA, będące mechanizmem kompensującym zaburzenia energetyczne wywołane mutacjami. Różnice w indukcji podwyższonego tempa oddychania między fibroblastami od żeńskiej nosicielki i męskich nosicieli mutacji LHON wskazują, że mutacje mogły działać niekorzystnie na metabolizm tylko komórek męskich, które musiały wytworzyć mechanizm umożliwiający osiągnięcie zbliżonej do komórek żeńskich i kontrolnych wydolności energetycznej, która pozwoliłaby im uniknąć śmierci komórkowej wynikającej z zaburzeń energetycznych.

Zwiększone tempo oddychania zanotowano także w liniach komórkowych cybryd z mutacjami LHON, a w dwóch liniach o najwyższym poziomie m.11778G>A zwiększonemu tempu oddychania komórkowego towarzyszyła także zwiększona wydolność oddechowa.

Zwiększona wydolność oddechowa mogłaby wynikać ze zwiększonej liczby kopii mtDNA i podwyższonej biogenezy mitochondriów w odpowiedzi na stres energetyczny wywołany mutacjami w mtDNA. Dowodów na potwierdzenie tej tezy mogą dostarczyć badania z ostatnich lat, w których udowodniono, że komórki krwi zdrowych nosicieli mutacji LHON mają znacznie podwyższony poziom mitochondriów oraz liczbę kopii mtDNA w stosunku do osób chorych oraz grupy kontrolnej (Giordano i wsp., 2014). W badaniach tej grupy zauważono także, że fibroblasty bezobjawowych nosicieli mutacji LHON wykazują najwyższą zdolność do indukcji biogenezy mitochondriów. Możliwe, że właśnie różnice w biogenezie mitochondriów i zwiększeniu liczby kopii mtDNA mogą stanowić czynnik rozróżniający chorych i zdrowych nosicieli mutacji LHON.

Mutacje LHON, które uniemożliwiłyby sprawny transport elektronów z kompleksu I na ubichinon, mogłyby zmusić komórkę do zastosowania szlaku alternatywnego, omijającego kompleks I i napędzającego produkcję ATP z  $\text{FADH}_2$  poprzez kompleks II. W takim przypadku zwiększenie ilości mitochondriów umożliwiłoby napędzanie sprawniejszej produkcji energii z kompleksu II. Z kompleksu II transport elektronów odbywa się bez zakłóceń, ponieważ mutacje m.11778G>A i m.3460G>A dotyczą tylko genów kodujących podjednostki kompleksu I. Potencjalnie większa liczba mitochondriów zwiększałaby ich udział w produkcji ATP. Nawet przy pełnej blokadzie kompleksu I, na który są przenoszone elektrony z NADH, bardziej korzystne energetycznie jest wzmoczenie fosforylacji oksydacyjnej poprzez transport elektronów z  $\text{FADH}_2$  bezpośrednio na kompleks II niż z samej glikolizy, ponieważ utlenienie cząsteczek  $\text{FADH}_2$  na łańcuchu oddechowym daje cztery razy więcej cząsteczek ATP niż powstaje podczas glikolizy (Berg, 2002). Dlatego możliwe, że komórki o wysokich zapotrzebowaniach energetycznych, jak np. komórki nerwu wzrokowego w LHON będą chętniej korzystały ze wzmoczonej biogenezy mitochondriów niż z podwyższonej aktywności glikolizy.

Interesująca jest obserwacja, że wzrost wydolności oddechowej w badanych komórkach jest wprost proporcjonalny do wzrostu poziomu heteroplazmii mutacji m.11778G>A, by przy 94% zmutowanych cząsteczek w cybrydach osiągnąć ponad dwukrotność wydolności oddechowej określonej dla grupy kontrolnej. Ponadto dla mutacji m.11778G>A, której poziom nie przekraczał 89% jak również dla m.3460G>A niezależnie od jej poziomu, nie zaobserwowano zwiększonej wydolności oddechowej. Takie wyniki sugerują, że zmiany metaboliczne w komórkach zmierzające ku zwiększeniu ich wydolności energetycznej uruchamiane są dopiero po przekroczeniu pewnego progu mutacji

m.11778G>A, a brak aktywacji takich zmian w komórkach z m.3460G>A oznacza, że mechanizm ten jest także zależny od rodzaju mutacji mitochondrialnej wywołującej chorobę.

Warto też zwrócić uwagę, że różne typy komórek wykazują zmienną zdolność do uruchamiania mechanizmów kompensujących produkcję ATP przy takim samym poziomie mutacji. Przy 94% poziomie heteroplazmii m.11778G>A w cybrydach wydolność oddechowa zwiększała się o 118% w stosunku do komórek kontrolnych, natomiast przy zbliżonym poziomie tej mutacji w fibroblastach i limfoblastach wydolności oddechowej komórek w stosunku do kontroli była zmienna - niższa lub wyższa. Oznacza to, że reakcja komórek cybryd na stres energetyczny ma tylko charakter poglądowy, a zdolność do indukcji zmian metabolicznych zmierzających ku zwiększeniu wydolności oddechowej jest specyficzna komórkowo. Ponadto zaobserwowano, że komórki fibroblastów od męskich nosicieli mutacji LHON mają zwiększone tempo oddychania, natomiast sytuacji tej nie zaobserwowano w męskich komórkach limfoblastów, co również może mieć znaczenie przy wyjaśnianiu przyczyn specyficzności tkankowej w przebiegu LHON.

W trakcie analizy wyników oddychania komórkowego zauważono także, że tempo oddychania limfoblastów z jedną mutacją m.11778G>A nie różni się o tempa oddychania linii z dwiema mutacjami LHON, co sugeruje, że obecność drugiej mutacji nie powoduje dodatkowych zaburzeń tego procesu w badanych komórkach. Byłoby to zgodne z obserwacjami okulistycznymi, gdzie pacjenci z dwiema mutacjami LHON nie chorowali ciężiej od nosicieli tylko jednej mutacji.

## **5.7 Analiza wpływu poziomu heteroplazmii mutacji wywołujących LHON na metabolizm różnych komórek**

Badania poziomów transkryptów z genów *ND1* i *ND4*, w których lokują się mutacje LHON wykonane na limfoblastach, fibroblastach i cybrydach wykazały, że nawet przy bliskim homoplazmii poziomie jednej z dwóch mutacji, nie obserwuje się zaburzonej proporcji między transkryptami obu genów. Analiza poszczególnych linii komórkowych pacjentów nie wykazała, aby wyższy poziom którejś z mutacji obniżał poziom transkrypcji tego genu w stosunku do drugiego. U każdego pacjenta, niezależnie od poziomu każdej z mutacji proporcja poziomów transkryptów między genami *ND1* i *ND4* była taka sama.

Jednak analizy na limfoblastach, fibroblastach i cybrydach przeprowadzone w ramach tej pracy, wykazały, że pomimo faktu, że LHON jest specyficzną chorobą mitochondrialną,

której objawy są ograniczone do komórek zwojowych siatkówki, to mutacje powodujące tę chorobę mogą modulować metabolizm komórek innych niż komórki nerwu wzrokowego. Przeprowadzone badania pozwoliły na stwierdzenie związku między wzrastającym poziomem mutacji LHON a produkcją wolnych rodników, zdolnością do wiązania rotenonu jak również zwiększaniem wydolności energetycznej komórek.

Trudniej określić korelację między uruchamianiem mechanizmów kompensujących produkcję ATP a poziomem heteroplazmii mutacji. W limfoblastach nie zanotowano zwiększonej wydolności oddechowej, nawet przy poziomie heteroplazmii m.11778G>A wynoszącym  $97,9\% \pm 0,1$ , natomiast zaobserwowano to zjawisko w liniach cybryd o niższym poziomie tej mutacji, przekraczającym już  $89,8\% \pm 1,0$  i, ale nie zaobserwowano jej przy niższym poziomie mutacji. Wyniki te wskazują, że w miarę wzrastającego poziomu mutacji zostają aktywowane mechanizmy kompensacji produkcji ATP, jednak poziom mutacji, który je aktywuje jest zróżnicowany komórkowo. Oznacza to, że analizy korelacji między poziomem mutacji a badaniem systemów kompensacji produkcji ATP należy przeprowadzać indywidualnie dla każdej linii komórkowej.

Ze względu na obecność dwóch mutacji mitochondrialnych jednocześnie nie można całkowicie określić wpływu wzrastającego poziomu jednej mutacji bez uwzględnienia stopnia heteroplazmii drugiej, co można zauważyć podczas analizy glikolizy w cybrydach. Wzmoczoną glikolizę uruchamiały komórki w linii cybryd z  $40,7\% \pm 0,7$  poziomem m.11778G>A i  $89,3\% \pm 0,6$  m.3460G>A. Można by było wyciągnąć wniosek, że przekroczenie progu 40% dla m.11778G>A wzmaga glikolizę, jednak w cybrydach z m.11778G>A, której poziom wynosił  $63,7\% \pm 0,6$  i  $5,4\% \pm 0,6$  dla m.3460G>A, nie obserwuje się śmierci na galaktozie, dlatego prawdopodobnie na wystąpienie wzmoczonej glikolizy w linii z niższym poziomem m.11778G>A miał wpływ wysoki poziom tej drugiej zmiany.

Warto również zauważyć, że w komórkach fibroblastów męskich nosicieli mutacji jest zdecydowanie wyższy poziom m.3460G>A niż w komórkach krwi tych pacjentów, jednak zróżnicowany poziom mutacji między różnymi komórkami ciała tych samych pacjentów jest cechą charakterystyczną wszystkich chorób mitochondrialnych, u których podstaw leżą mutacje w mtDNA. Wyższy poziom tej mutacji w fibroblastach niż we krwi nie wpływa na większą wrażliwość tych komórek na czynniki proapoptotyczne, co potwierdza dane kliniczne, wskazujące, że nawet przy wysokim poziomie mutacji w różnych komórkach ciała pacjentów z LHON, nie obserwuje się innych objawów choroby poza utratą wzroku.

Przedstawione wyniki wskazują, że poziom heteroplazmii mutacji jest bardzo istotnym parametrem przy analizach zmian metabolicznych w komórkach, a jego pominięcie, poprzez łączenie pacjentów we wspólną grupę bez uwzględnienia zróżnicowanego poziomu heteroplazmii mutacji może skutkować pominięciem ważnych informacji wskazujących mechanizm patogenezy tej choroby.

## 5.8 Korelacje genotyp-czynniki środowiska-fenotyp w LHON

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują, że zarówno czynniki środowiskowe jak i jądrowe geny modyfikujące mogą pełnić istotną rolę w ekspresji mutacji LHON.

Bardzo prawdopodobne, że na młodszy wiek zachorowania u pacjentów p.1, p.3 i p.6 w stosunku do p.7 miał fakt, że jak wynika z wywiadu rodzinnego, pacjenci Ci byli palaczami, a jak udowodniły badania Kirkmana i wsp. (2009) palenie zwiększa penetrację choroby u nosicieli mutacji LHON.

Za wpływem genomu jądrowego, a także czynników środowiskowych na ujawnienie się choroby przemawia także fakt, że wszyscy pacjenci z dwiema mutacjami LHON należą do mitochondrialnej haplogrupy H, która jak wskazują badania jest czynnikiem chroniącym przed LHON u nosicieli mutacji m.11778G>A (Zhang i wsp., 2011).

Bliźnięta w analizowanej rodzinie, jak wykazały analizy profilu jądrowego fibroblastów, nie są bliźniętami jednojajowymi, dlatego trzeba ich traktować jak każdą inną parę rodzeństwa od tych samych rodziców, a analizy ich komórek krwi i fibroblastów nie wykazały istotnych różnic szczególnie między tymi braćmi.

## 5.9 Analiza udziału aktywacji kaspaz i PARP-1 w pośredniczeniu w procesie apoptozy w komórkach z mutacjami LHON

Choć Dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera jest chorobą intensywnie analizowaną na szeregu modeli komórkowych, to nadal mechanizm doprowadzający do śmierci komórek zwojowych siatkówki nie jest jasno sprecyzowany. Kwestią sporną jest również ścieżka, na której zachodzi śmierć komórek nerwu wzrokowego. Najczęściej postulowaną ścieżką jest apoptoza, gdyż w przebiegu choroby nie obserwuje się objawów zapalenia charakterystycznego dla nekrozy. Mimo że badania na cybrydach wykazują

zwiększoną wrażliwość komórek z mutacjami LHON na hodowlę z galaktozą, to w wielu przypadkach nie wykrywa się charakterystycznej dla apoptozy aktywności kaspaz, dlatego możliwe, że śmierć tych komórek zachodzi na drodze niezależnej od nich.

W przeprowadzonych w ramach tej pracy eksperymentach zbadano proces apoptozy mierząc stopień fragmentacji DNA jak również aktywność kaspaz 3 i 7 oraz profil proteolizy białka PARP-1. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyciągnięcie kilku wniosków dotyczących przebiegu apoptozy w komórkach z mutacjami LHON.

Po pierwsze zaobserwowano, że hodowla z galaktozą spowodowała śmierć komórek limfoblastów zdrowej nosicielki dwóch mutacji LHON, natomiast te same warunki hodowli nie wywoływały apoptozy w komórkach fibroblastów tej pacjentki, mimo posiadania przez nią w obu typach komórek niemal identycznego poziomu obu mutacji ( $97,7\% \pm 0,2$  dla m.11778G>A i  $3,5\% \pm 0,4$  dla m.3460G>A w limfoblastach i odpowiednio  $97,4\% \pm 0,1$  i  $2,7\% \pm 0,3$  dla fibroblastów). Choć u badanych pacjentów nie wystąpiły zaburzenia ze strony układu krwiotwórczego, to uzyskane wyniki wskazują, że poszczególne typy komórek mogą mieć zróżnicowaną wrażliwość na te same czynniki stresowe, co jednocześnie sugeruje specyficzność komórkową związaną z penetracją mutacji LHON. Oznacza to, że do podobnej specyficzności komórkowej może dochodzić w organizmie chorych, jednak w tym przypadku komórkami, w których dochodzi do ekspresji choroby są komórki zwojowe siatkówki.

Po drugie zauważono, że w zależności od zastosowanego czynnika stresowego komórki mogą umierać na drodze apoptozy zależnej lub niezależnej od aktywności kaspaz. Sytuację taką zaobserwowano w jednej linii limfoblastów i jednej linii cybryd, w których hodowla na galaktozie lub rotenonie skutkowałą wzmożoną fragmentacją DNA. Zauważono, że w obu typach komórek hodowla z galaktozą wywoływała charakterystyczną dla apoptozy międzynukleosomalną fragmentację DNA, ale procesowi temu nie towarzyszyła zwiększona aktywność kaspaz. Natomiast hodowla na rotenonie wskazała istotne różnice między komórkami. W limfoblastach fragmentacji DNA towarzyszyło zwiększenie aktywności kaspaz, natomiast w cybrydach fragmentacji DNA oraz kondensacji chromatyny i fragmentacji jąder komórkowych charakterystycznych dla apoptozy towarzyszył spadek aktywności kaspaz.

Różnica w sposobie zachodzenia śmierci komórkowej w różnych warunkach hodowli w tych dwóch typach komórek może wynikać z zasobów energetycznych jakie mają te linie w danych warunkach hodowli. Jeśli komórki w znacznym stopniu produkowały ATP z glikolizy, wtedy usunięcie glukozy z pożywki mogło spowodować deplecję ATP i nie były



one w stanie wejść na drogę śmierci wymagającej kosztownej energetycznie aktywności kaspaz, dlatego ich aktywność została zahamowana i komórki umierały na drodze niezależnej od ich aktywności. Natomiast stres wywołany zahamowaniem funkcjonowania kompleksu I łańcucha oddechowego przez rotenon wywołał wzmożoną fragmentację DNA zależną od kaspaz w linii limfoblastów a nie cybryd, ponieważ tylko limfoblasty były w stanie wyprodukować z glikolizy odpowiednią ilość energii do przeprowadzenia klasycznej apoptozy. Możliwe, że dostępność odpowiedniej ilości ATP jest właśnie czynnikiem, który warunkuje czy komórka z mutacjami LHON przeprowadza apoptozę zależną lub niezależną od kaspaz. Niewystarczająca ilość ATP do aktywacji kaspaz w wyniku niewydolności łańcucha oddechowego i systemów kompensujących produkcję energii, mogłaby tłumaczyć obserwowaną w ramach niniejszej pracy oraz w doniesieniach literaturowych (Carelli i wsp., 2004; Zanna i wsp., 2003) niską aktywność lub brak detekcji kaspaz w przebiegu apoptozy w komórkach z mutacjami LHON.

Niska aktywność kaspaz w trakcie apoptozy niektórych komórek może wynikać nie tylko z niedostatecznej ilości ATP, ale także z możliwości ich inaktywacji. Dowodów na słuszność tej hipotezy mogą dostarczyć wyniki eksperymentów na komórkach cybryd hodowanych na rotenonie. W warunkach hodowli z rotenonem profil proteolizy białka PARP-1, będącego substratem dla analizowanych kaspaz, wskazuje na ich wzmożoną aktywność we wszystkich komórkach cybryd, podczas gdy analiza luminescencyjna nie wykazała wzrostu ich aktywności, a nawet istotny statystycznie spadek w cybrydach linii z 90% poziomem heteroplazmii m.11778G>A. Rozbieżności między zauważalnym spadkiem aktywności kaspaz i wzorem proteolizy białka PARP-1 w warunkach hodowli na rotenonie mogą wynikać właśnie z możliwego zahamowania działania aktywowanych kaspaz. Eksperyment trwał 24 godziny, zatem możliwe, że w początkowej fazie komórki odpowiadały na stres aktywacją kaspaz, jednak późniejsze zaburzenia metaboliczne komórek mogły doprowadzić do ich zahamowania i w końcowej fazie eksperymentu były aktywne na znacznie niższym poziomie. Możliwe, że zahamowanie aktywności kaspaz wynikało z uruchomienia równoległej ścieżki śmierci komórkowej lub mechanizmu antyapoptotycznego, który nie mógł zachodzić w obecności wysokiego poziomu kaspaz. Ponadto kaspazy mogły zostać inaktywowane na skutek wzrastającego stresu oksydacyjnego, tak jak obserwowano to w przypadku hodowli *in vitro* komórek siatkówki w mysim modelu zwyrodnienia barwnikowego siatkówki. Kaspazy mogą zostać inaktywowane poprzez oksydację grup tiolowych w aktywnej części enzymu (Carmody i Cotter, 2000).

Najistotniejszy statystycznie spadek aktywności kaspaz na rotenonie zanotowano w cybrydach pacjenta o 90% poziomie m.11778G>A, jednak proteoliza PARP-1 wykazała u niego tylko formę ciętą (89kDa) świadczącą o aktywacji kaspaz. Jednak z uwagi na określoną u niego zwiększoną wydolność oddechową, zapewne z powodu zwiększonej liczby mitochondriów, możliwe, że inhibicja rotenonem spowodowała w tych komórkach dużo większy stres oksydacyjny niż w pozostałych cybrydach, właśnie ze względu na większą ilość mitochondriów, a wysoki poziom wolnych rodników tlenowych mógł się przyczynić do późniejszej inaktywacji kaspaz, w dużo większym stopniu niż w pozostałych cybrydach. Oksydacyjna inaktywacja kaspaz tłumaczyłaby także zmniejszoną ilość wolnych nukleosomów w cybrydach o najniższym poziomie obu mutacji LHON hodowanych na galaktozie, gdzie istotnemu statystycznie spadkowi ilości wolnych nukleosomów towarzyszył także istotny statystycznie spadek aktywności kaspaz. Jeśli dodatkowe eksperymenty potwierdziłyby taki mechanizm inaktywacji kaspaz, wtedy byłby to dodatkowy i istotny dowód na duży wkład stresu oksydacyjnego do patogenezy LHON, jak również takie potwierdzenie umożliwiłoby skierowanie terapii przede wszystkim na obniżenie stresu oksydacyjnego.

Następnym istotnym wynikiem uzyskanym w ramach analizy apoptozy w niniejszej pracy jest stwierdzenie różnic w podstawowej aktywności kaspaz 3 i 7 między liniami komórkowymi zarówno pacjentów z mutacjami LHON jak i osób grupy kontrolnej. Najwyższą aktywność kaspaz zanotowano w limfoblastach a najniższą w fibroblastach. Taki wynik sugeruje, że poziom aktywności kaspaz jest specyficzny dla danego typu komórek, zatem posiadają one także inny próg potrzebny do aktywacji programowanej śmierci komórkowej. Takie wyniki wskazują, że mierzenie aktywności kaspaz 3 i 7 i ich wrażliwości na czynniki stresowe w jednym typie komórek może być nieadekwatne do poziomu i wrażliwości innego typu komórek. Z tego powodu przedstawione modele komórkowe mają charakter jedynie poglądowy na to, jakie procesy mogą zachodzić w nerwie wzrokowym pacjentów z mutacjami LHON i służą wskazaniu zaburzeń i mechanizmów, jakie zachodzą w badanych liniach komórkowych, ale nie odzwierciedlają faktycznego stanu metabolicznego w zajętych chorobą komórkach zwojowych siatkówki.

W trakcie analiz apoptozy w linii limfoblastów spodziewano się wyższej wrażliwości komórek na czynniki proapoptotyczne w liniach z dwiema mutacjami niż w linii tylko z m.11778G>A, jednak nie wykazano takiej zależności. Wyniki analizy apoptozy z galaktozą w linii limfoblastów pozwalają na stwierdzenie, że obecność dwóch mutacji LHON nie



zwiększa wrażliwości tego typu komórek na apoptozę, ponieważ większość komórek z dwiema mutacjami nie wykazywała podwyższonej fragmentacji DNA w tych warunkach w stosunku do zdrowej nosicielki m.11778G>A. Jednak, aby w pełni wykluczyć hipotezę, że mutacje te nie działają synergistycznie i nie zwiększają śmiertelności komórek, należałoby porównać linie z dwiema mutacjami z większą liczbą linii zawierających pojedyncze mutacje LHON.

Ostatnią kwestią związaną z analizą apoptozy w komórkach z mutacjami LHON jest udział polimerazy PAR-1 w tym procesie. Badania na zwierzętach z ostatnich lat wskazują, że komórki męskie i żeńskie mogą umierać na odmiennej ścieżce apoptozy, w którą zaangażowane są inne białka. Analizy wykazują na przykład, że udar niedokrwienny wywołuje w neuronach żeńskich apoptozę zależną od kaspaz, natomiast w śmierć komórek męskich zaangażowany jest czynnik AIF i polimeraza PAR-1. Ponadto zauważono, że wyciszenie genu PARP-1 miało działanie neuroprotekcyjne w przypadku indukcji udaru jedynie w komórkach męskich (Lang i McCullough, 2008). Wyniki wskazujące na uruchamianie odmiennych ścieżek apoptozy w komórkach męskich i żeńskich w odpowiedzi na czynniki stresowe mogłyby również tłumaczyć zróżnicowaną płciowo ekspresję LHON. Jednak wyniki badań przedstawionych w niniejszej pracy nie wskazują na istotne zaangażowanie białka PARP-1 w wewnętrzną ścieżkę apoptozy w komórkach z mutacjami LHON.

Jeśli faktycznie polimery ADP-rybozy wytwarzane podczas aktywacji PARP-1 ułatwiałyby translokację AIF do jądra komórkowego i zapoczątkowanie fragmentacji DNA z udziałem endonukleazy G (Lang i McCullough, 2008), wtedy powinno móc się zaobserwować wysoki poziom formy aktywnej tego białka (116kDa), jednak tego w przeprowadzonych w niniejszej pracy analizach nie zanotowano. We wszystkich badanych liniach komórkowych zarówno męskich jak i żeńskich oraz w komórkach cybryd z mutacjami LHON hodowanych na rotenonie zaobserwowano wysoki poziom proteolizy PARP-1 (89kDa), która była formą nieaktywną białka. Jedynie w przypadku hodowli na galaktozie dwóch linii limfoblastów zdrowych nosicieli mutacji LHON indukcja apoptozy nie była skorelowana ze zwiększoną proteolizą tego białka, ale trzeba zaznaczyć, że komórki te pochodzą od osób zdrowych, i nie muszą reagować na czynnik stresowy w identyczny sposób jak komórki od chorych nosicieli. Właśnie te różnice między komórkami chorych i zdrowych nosicieli mutacji LHON i różnice w przeprowadzaniu procesu apoptozy mają istotne znaczenie w analizie mechanizmu choroby, a wyniki przeprowadzonych analiz nie wskazują,

żeby PARP-1 pełnił istotną rolę w przebiegu apoptozy niezależnej od kaspaz obserwowanej w komórkach chorych na LHON.

### **5.10 Analiza wpływu mutacji LHON na indukcję i prawidłowy przebieg procesu autofagii**

Ze względu na fakt, że przyczyna śmierci komórek zwojowych siatkówki w LHON nadal nie została jednoznacznie ustalona, istotne jest aby sprawdzić jaki jest udział różnych ścieżek programowanej śmierci komórkowej w patomechanizmie tej choroby, dlatego w ramach niniejszej pracy postanowiono przeprowadzić analizy procesu autofagii w komórkach pacjentów z dwiema mutacjami LHON (m.11778G>A oraz m.3460G>A). Do chwili obecnej nie ma dostępnych w literaturze żadnych danych dotyczących przebiegu tego procesu u osób z LHON, dlatego wnioski w takim przypadku można jedynie wyciągnąć na podstawie porównania otrzymanych wyników z obserwacjami okulistycznymi, tego co się dzieje w nerwie wzrokowym oraz z wynikami analizy autofagii w przebiegu innych chorób neurodegeneracyjnych.

Uzyskane w ramach niniejszej rozprawy wyniki wskazują na duże różnice w poziomie autofagii podstawowej między różnymi liniami komórkowymi, co sugeruje, że poszczególne komórki w organizmie mają w różnym stopniu rozwinięty mechanizm ochronny przed nagromadzeniem defektywnie działających organelli. W warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego rotenonem poziom autofagii we wszystkich typach komórek (limfoblastach, fibroblastach i cybrydach) jest zbliżony wskazując, że jest to czynnik szkodliwy dla wszystkich typów komórek. W kontekście LHON, różnica w indukcji autofagii między różnymi typami komórek mogłaby mieć znaczenie w próbach wskazania przyczyn specyficzności tkankowej występującej w tej chorobie i ograniczenia ekspresji LHON tylko do komórek zwojowych siatkówki.

Analizy autofagii w komórkach cybryd z niektórymi mutacjami mitochondrialnymi wskazują, że poziom autofagii podstawowej w tych cybrydach nie różni się od komórek kontrolnych (Gilkerson i wsp., 2012). Wyniki otrzymane w niniejszej rozprawie doktorskiej potwierdzają te obserwacje. Analizy linii komórkowych limfoblastów i fibroblastów nie wykazały wyższego poziomu makroautofagii w komórkach z mutacjami LHON w stosunku do komórek kontrolnych we wszystkich warunkach hodowli, co oznacza, że sama obecność tych mutacji nie była wystarczająca do indukcji tego procesu lub obecność mutacji zaburzyła

prawidłowy przebieg autofagii. Za brakiem efektywnego procesu eliminacji mitochondriów z mutacjami LHON w tych komórkach może również przemawiać fakt, że w niektórych z nich mutacje osiągnęły bardzo wysoki poziom.

Najnowsze badania wskazują, że do efektywnej indukcji autofagii mitochondriów zawierających zmutowane mtDNA niezbędne jest zarówno zahamowanie ścieżki mTORC1 i utrata potencjału błonowego mitochondriów. Zahamowanie tylko jednego z tych procesów nie skutkowało zwiększoną degradacją mitochondriów na drodze autofagii. Niezbędny w mitofagii jest również udział białek PINK1 i Parkin, których poziom był znacznie obniżony w cybrydach z mutacjami takich chorób mitochondrialnych jak MELAS i NARP (Gilkerson i wsp., 2012). Wynik taki wskazuje, że przyczyną braku zaobserwowanej w niniejszej pracy wzmożonej indukcji autofagii komórek z mutacjami LHON mogłyby być właśnie zaburzenia w rekrutacji mitochondriów do degradacji.

Na upośledzoną mitofagię w komórkach z mutacjami LHON mogłyby także wskazywać dane literaturowe dotyczące analiz histologicznych nerwu wzrokowego chorych na tę chorobę, gdzie wielokrotnie wykrywano akumulację mitochondriów (Carelli i wsp., 2004). Nie wydaje się, żeby w analizowanych w niniejszej pracy komórkach problem nieefektywnej autofagii spowodowany był zaburzeniami inaktywacji ścieżki mTORC1, ponieważ indukcję makroautofagii podstawowej zanotowano zarówno w komórkach fibroblastów jak i cybryd z mutacjami LHON. Dlatego dysfunkcja mitofagii w tych komórkach mogłaby być spowodowana niekompletnym obniżeniem potencjału błonowego i zaburzoną rekrutacją białek niezbędnych do mitofagii. W niniejszej pracy nie analizowano samego procesu mitofagii i białek w nią bezpośrednio zaangażowanych, ale uzyskane wyniki dla makroautofagii w powiązaniu z danymi literaturowymi wskazują, że warto kontynuować badania nad tym procesem w przebiegu LHON.

Drobne różnice w poziomie autofagii między komórkami z mutacjami a kontrolnymi jak również między liniami z różnym poziomem mutacji dostrzeżono jedynie w liniach cybryd w warunkach hodowli z rotenonem.

Komórki cybryd z m.3460G>A, której poziom przekracza 89%, w warunkach inhibicji rotenonem wykazują najwyższą ze wszystkich cybryd z mutacjami jak i większości komórek kontrolnych ekspresję LC3-II. Taki wynik może wskazywać, że mutacja ta silniej pobudza ten proces niż m.11778G>A. Jednak podwyższony poziom białka LC3-II w tych komórkach nie był skorelowany z niższym poziomem białka p62, który wskazywałby na szybsze degradowanie autofagosomów. Może to oznaczać, że mimo iż zmiany metaboliczne

wywołane tą mutacją mogą pobudzać autofagię w tych komórkach, to prawdopodobnie nie dochodzi do prawidłowej eliminacji autofagosomów.

Potencjalne opóźnienie procesu degradacji autofagosomów w komórkach z wysokim poziomem m.3460G>A mogłoby być spowodowane na przykład problemami z transportem autofagosomów. Zablokowany transport aksonalny w neuronach uniemożliwiałby wydajny transport autofagosomów do ciała komórki i ich połączenie z lizosomami oraz degradację autofagosomów, co prowadziłoby do ich akumulacji w aksonach, a brak eliminacji dysfunkcyjnych białek i organelli komórkowych zwiększałby toksyczność dla tej części neuronu prowadząc do jego degeneracji. Akumulację autofagosomów w dotkniętych degeneracją neuronach obserwowano w przebiegu wielu chorób neurodegeneracyjnych jak choroba Alzheimera, Huntingtona, Parkinsona czy w Ołpieniu Czołowo-Skroniowym (Lee, 2012).

Teorię tą mogłyby także potwierdzać obserwacje dotyczące akumulacji autofagosomów w spuchniętych regionach aksonów komórek Purkiniego w mysim modelu degeneracji mózdzku (Wang i wsp., 2006). W modelu tym jednym z pierwszych symptomów dystrofii nerwowej jest aktywacja autofagii, jednak detekcja dużej liczby autofagosomów w komórkach sugeruje, że została ona zahamowana na etapie degradacji. Możliwe, że do podobnej sytuacji mogłoby dochodzić w degenerujących komórkach zwojowych siatkówki. Nagromadzenie autofagosomów i ich opóźniona degradacja mogłyby prowadzić do zwiększonej objętości komórki, wrażeń jej obrzmienia. Obrzmienie włókien nerwowych komórek zwojowych obserwuje się w badaniach okulistycznych pacjentów z LHON, dlatego zaburzenia autofagii spowodowane m.3460G>A mogłyby mieć podobny przebieg do tego obserwowanego w mysich komórkach Purkiniego.

Odminną sytuację zanotowano w linii cybryd o blisko 90% poziomie heteroplazmii m.11778G>A, w których hodowla z rotenonem nie wywołała tak silnej indukcji autofagii jak w pozostałych liniach z mutacjami LHON, co przejawiało się niskim poziomem białka LC3-II oraz brakiem istotnego wzrostu ilości autofagosomów w obserwacjach mikroskopowych. Podobną sytuację zaobserwowano także w dwóch liniach limfoblastów z poziomem heteroplazmii m.11778G>A przekraczającym 96%, w których hodowla na galaktozie nie skutkowała ekspresją białka LC3-II. Takie wyniki mogą sugerować, że w niektórych komórkach z m.11778G>A autofagia nie jest pobudzana w odpowiednim stopniu, co może skutkować nagromadzeniem dysfunkcyjnych mitochondriów w komórkach.

Dowodów na słuszność takiej hipotezy mogą dostarczyć dane literaturowe. W badaniach histopatologicznych nerwu wzrokowego pacjentów z LHON wykrywa się degenerację aksonów i akumulację mitochondriów (Carelli i wsp., 2009). Dodatkowo w obrzmiałych aksonach nerwu wzrokowego izolowanych z niedawno skonstruowanych myszy z ekspresją mutacji LHON w genie *ND6* (Lin i wsp., 2012) oraz najczęstszą mutacją m.11778G>A w genie *ND4* (Yu i wsp., 2012) zanotowano akumulację mitochondriów.

Przeprowadzone w niniejszej pracy analizy autofagii komórek z mutacjami LHON w powiązaniu z danymi literaturowymi wskazują, że m.11778G>A i m.3460G>A mogą mieć wpływ na proces autofagii. Prawdopodobnie obie mutacje w odmienny sposób mogą zaburzać proces degradacji dysfunkcyjnych mitochondriów prowadząc do ich akumulacji w komórkach, czego konsekwencją może być ich śmierć. Przedstawione w tej pracy wyniki analizy autofagii mają charakter wstępny i wymagają weryfikacji na większej liczbie linii komórkowych z mutacjami LHON oraz z zastosowaniem dodatkowych czynników stresowych.

## **PODSUMOWANIE**

W ramach niniejszej pracy doktorskiej spróbowano zbadać podstawy molekularne Dziedzicznej neuropatii wzrokowej Lebera poprzez analizę różnych procesów metabolicznych na trzech różnych modelach komórkowych oraz powiązać otrzymane wyniki z obserwowanymi zmianami w nerwie wzrokowym. W pracy skupiono się także na poszukiwaniu nowych mutacji przyczyniających się do rozwoju tej choroby.

Na podstawie otrzymanych wyników wykazano, że u podstaw choroby mogą stać zaburzenia metaboliczne komórek związane między innymi z nadmierną produkcją wolnych rodników tlenowych i degradacją dysfunkcyjnych organelli oraz brakiem efektywnych systemów produkcji ATP, które mogą być specyficzne komórkowo i zależne od poziomu i rodzaju mutacji LHON. Do najważniejszych wyników uzyskanych w niniejszej pracy należą:

- Zidentyfikowanie dwóch rzadkich mutacji mitochondrialnych m.3635G>A i m.13042G>A u pacjentów z zanikiem nerwu wzrokowego.
- Ustalenie, że komórki z dwiema mutacjami LHON mają podwyższoną produkcję wolnych rodników tlenowych, w szczególności rodników ponadtlenkowych, w stosunku do komórek bez mutacji w mtDNA, a intensywność stresu oksydacyjnego zależy od poziomu mutacji. Zwiększony poziom ROS w badanych komórkach może wynikać z zakłóconego przepływu elektronów między kompleksem I i ubichinonem.
- Wykazanie, że m.3460G>A w stanie heteroplazmatycznym nie uniewrażliwia komórek cybryd na działanie rotenonu. Jest to sprzeczne z wynikami literaturowymi otrzymanymi dla płytek krwi, co sugeruje zmienną penetrację tej mutacji w zależności od typu komórki.
- Stwierdzenie, że komórki z mutacjami LHON uruchamiają różne mechanizmy kompensujące produkcję ATP na zasadzie wzmożonej glikolizy oraz podwyższenia tempa oddychania komórkowego i zwiększenia wydolności oddechowej.

Od wydajności systemów kompensujących produkcję ATP zależy zdolność komórek do przezwyciężenia negatywnych skutków mutacji.

- Wykazanie, że wydolność oddechowa komórek jest uzależniona od rodzaju i poziomu mutacji i wzrasta wprost proporcjonalnie do rosnącego poziomu m.11778G>A.
- Udowodnienie, że mutacje powodujące LHON mogą modulować metabolizm komórek innych niż komórki nerwu wzrokowego, a ważnym parametrem wpływającym na intensywność różnych zmian metabolicznych w analizowanych komórkach (apoptoza, produkcja wolnych rodników tlenowych, uruchamianie systemów kompensacji produkcji ATP, zdolność do wiązania rotenonu) jest poziom heteroplazmii danej mutacji.
- Wykazanie, że stres metaboliczny wywołany hodowlą komórek z mutacjami LHON na pożywce zmuszającej ją do produkcji ATP z fosforylacji oksydacyjnej (galaktoza) bądź wywołany hodowlą z inhibitorem kompleksu I (rotenon) może wpływać na zmniejszenie aktywacji kaspaz. Możliwe, że inaktywacja kaspaz odbywa się na drodze oksydacyjnej modyfikacji tych enzymów, bądź wynika z niedostatecznej produkcji ATP do przeprowadzenia apoptozy zależnej od tych proteaz, wynikającej z niewydolności łańcucha oddechowego lub systemów kompensujących niedobry energii w komórkach.
- Stwierdzenie, że polimeraza PAR-1 nie bierze czynnego udziału w przebiegu apoptozy niezależnej od kaspaz w komórkach z mutacjami LHON.
- Udowodnienie, że między różnymi komórkami z mutacjami LHON istnieją różnice w podstawowej aktywności kaspaz oraz zdolności do indukowania procesu autofagii.
- Obserwacja, że obecność mutacji LHON może wpływać na przebieg procesu autofagii, a wpływ ten może być uzależniony od rodzaju mutacji.



## LITERATURA

1. Abu-Amero K.K. *Leber's hereditary optic neuropathy: the mitochondrial connection revisited*. Ophthalmic Genetics 18 (1): 17-23, 2011
2. Acehan D., Jiang X., Morgan D.G., Heuser J.E., Wang X., Akey C.W. *Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation*. Molecular Cell 9 (2): 423-432, 2002
3. Achilli A., Iommarini L., Olivieri A., Pala M., Kashani B.H., Reynier P., La Morgia C., Valentino M.L., Liguori R., Pizza F., Barboni P., Sadun F., De Negri A.M., Zeviani M., Dollfus H., Moulignier A., Ducos G., Orssaud C., Bonneau D., Procaccio V., Leo-Kottler B., Fauser S., Wissinger B., Amati-Bonneau P., Torroni A., Carelli V. *Rare primary mitochondrial DNA mutations and probable synergistic variants in Leber's hereditary optic neuropathy*. PLoS One 7 (8): 1-11, 2012
4. Arnoult D., Gaume B., Karbowski M., Sharpe J.C., Cecconi F., Youle R.J. *Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization*. The EMBO Journal 22 (17): 4385-4399, 2003
5. Baek S.H., Bae O.N., Kim E.K., Yu S.W. *Induction of mitochondrial dysfunction by poly(ADP-ribose) polymer: implication for neuronal cell death*. Molecules and Cells 36 (3): 258-266, 2013
6. Bandelt H.J., Brandstätter A.K., Richards M.B., Yao Y.G., Logan I. *The case for the continuing use of the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) and the standardization of notation in human mitochondrial DNA studies*. Journal of Human Genetics 59 (2): 66-77, 2014
7. Barbour J.A., Turner N. *Mitochondrial stress signaling promotes cellular adaptations*. International Journal of Cell Biology 2014: 1-12, 2014
8. Bayona-Bafaluy M.P., Manfredi G., Moraes C.T. *A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to  $\rho^0$  cells*. Nucleic Acid Research 31 (16): 2-4, 2003
9. Benard G., Bellance N., James D., Parrone P., Fernandez H., Letellier T., Rossignol R. *Mitochondrial bioenergetics and structural network organization*. Journal of Cell Science 120 (5): 838-848, 2007

10. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. *Biochemistry*. Edycja: 5, W.H.Freeman & Company, 18.6.7: 774-775, 2002
11. Biousse V., Brown M.D. Newman N.J., Allen J.C., Rosenfeld J., Meola G., Wallace D.C. *De novo 14484 mitochondrial DNA mutation in monozygotic twins discordant for Leber's hereditary optic neuropathy*. *Neurology* 49 (4): 1136-1138, 1997
12. Blok M.J., Spruijt L., de Coo I.F.M., Schoonderwoerd K., Hendrickx A., Smeets H.J. *Mutations in the ND5 subunit of complex I of the mitochondrial DNA are a frequent cause of oxidative phosphorylation disease*. *Journal of Medical Genetics* 44: 1-5, 2007
13. Brown M.D, Trounce I.A., Jun A.S., Allen J.C., Wallace D.C. *Functional analysis of lymphoblast and cybrid mitochondria containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation*. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (51): 39831-39836, 2000
14. Brown M.D., Allen J.C., Van Stavern G.P., Newman N.J., Wallace D.C. *Clinical, genetic, and biochemical characterization of a Leber hereditary optic neuropathy family containing both the 11778 and 14484 primary mutations*. *American Journal of Medical Genetics* 104 (4): 331-338, 2001
15. Brown M.D., Zhadanov S., Allen J.C., Hosseini S., Newman N.J., Atamonov V.V., Mikhailovskaya I.E., Sukernik R.I., Wallace D.C. *Novel mtDNA mutations and oxidative phosphorylation dysfunction in Russian LHON families*. *Human Genetics* 109 (1): 33-39, 2001
16. Burman J.L., Yu S., Poole A.C., Decal R.B., Pappanck L. *Analysis of neuronal subtypes reveals selective mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons from parkin mutants*. *PNAS* 109 (26): 10438-10443, 2012
17. Cameron J.M., Levandovsky V., MacKay N., Robinson B.H. *Respiratory chain analysis of skin fibroblasts in mitochondrial disease*. *Mitochondrion* 4 (5-6): 387-394 2004
18. Cannino G., Di Liegro C.M., Rinaldi A.M. *Nuclear-mitochondrial interaction*. *Mitochondrion* 7 (6): 359-366, 2007
19. Carelli V., La Morgia C., Iommarini L., Carroccia R., Mattiazzi M., Sangiorgi S. Farné S., Maresca A., Foscari B., Lanzi L., Amadori M., Bellan M., Valentino M.L. *Mitochondrial optic neuropathies: how two genomes may kill the same cell type?* *Bioscience Reports* 27 (1-3): 173-84, 2007

20. Carelli V., La Morgia C., Valentino M.L., Barboni P., Ross-Cisneros F.N., Sadun A.A. *Retinal ganglion cell neurodegeneration in mitochondrial inherited disorders*. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics 1787 (5): 518–528, 2009
21. Carelli V., Ross-Cisneros F.N., Sadun A.A. *Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies*. Progress in Retinal and Eye Research 23 (1): 53-89, 2004
22. Carelli, V., Achilli, A., Valentino, M. L., Rengo, C., Semino, O., Pala, M., Olivieri, A., Mattiazzi, M., Pallotti, F., Carrara, F., Zeviani, M., Leuzzi, V., Carducci, C., Valle, G., Simionati, B., Mendieta, L., Salomao, S., Belfort, R., Jr., Sadun, A. A., Torroni, A. *Haplogroup effects and recombination of mitochondrial DNA: novel clues from the analysis of Leber hereditary optic neuropathy pedigrees*. American Journal of Human Genetics 78 (4): 564-574, 2006
23. Carmody R.J., Cotter T.G. *Oxidative stress induces caspase-independent retinal apoptosis in vitro*. Cell Death and Differentiation 7 (3): 282-291, 2000
24. Chaitanya G.V., Steven A.J. Babu P.P. *PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration*. Cell Communication and Signaling 8 (31): 1-11, 2010
25. Chalmers R.M., Schapira A.H.V. *Clinical, biochemical and molecular genetic features of Leber's hereditary optic neuropathy*. Biochimica et Biophysica Acta 1410 (2):147-158, 1999
26. Cheng L., Zhang D.Y. *Molecular Genetic Pathology*. Edycja: 1, Humana Press, Springer Science & Business Media, 5: 28-30, 2008
27. Cherra S.J., Dagda R.K., Chu C.T. *Autophagy and neurodegeneration: survival at a cost?* Neuropathology and Applied Neurobiology 36 (2): 125-132, 2010
28. Cherry A.B.C, Gagne K.G., McLoughlin E.M., Baccei A., Gorman B., Hartung O., Miller J.D., Zhang J., Zon R.L., Ince T.A., Neufeld E.J., Lerou P.H., Fleming M.D., Daley G.Q., Agarwal S. *Induced pluripotent stem cells with a pathological mitochondrial DNA deletion*. Stem Cells 31 (7): 1287-1297, 2013
29. Cheung Z.H., Ip N.Y. *Autophagy deregulation in neurodegenerative diseases – recent advances and future perspectives*. Journal of Neurochemistry 118 (3): 317-325, 2011
30. Chinnery P.F. *Mitochondrial Disorders Review*. NCBI Bookshelf: GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; (1993-2015): 1-49, 2014
31. Chinnery P.F., Schon E.A. *Mitochondria*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry 74 (9): 1188-1199, 2003

32. Cotán D., Cordero M.D., Garrido-Maraver J., Oropesa-Àvila M., Rodríguez-Hernández À., Izquierdo L.G., De la Mata M., De Miguel M., Lorite J.B., Infante E.R., Jackson S., Navas P., Sánchez-Alcazár J.A. *Secondary coenzyme Q<sub>10</sub> deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS fibroblasts*. The FASEB Journal 25 (8): 2669-2687, 2011
33. D'Amours D., Sallmann F.R., Dixit V., Poirier G.G. *Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis*. Journal of Cell Science 114 (20): 3771-3778, 2001
34. Danielson S. R., Wong A., Carelli V., Martinuzzi A., Schapira A. H. V., Cortopassi G. A. *Cells bearing mutations causing Leber's hereditary optic neuropathy are sensitized to Fas-induced apoptosis*. The Journal of Biological Chemistry 277 (8): 5810-5815, 2002
35. De la Mata M., Garrido-Maraver J., Cotán D., Cordero M.D., Oropesa-Àvila M., Izquierdo L.G., De Miguel M., Lorite J.B., Infante E.R., Ybot P., Jackson S., Sánchez-Alcazár J.A. *Recovery of MERRF fibroblasts and cybrids pathophysiology by coenzyme Q<sub>10</sub>*. Neurotherapeutics 9 (2): 446-463, 2012
36. De Souza-Pinto N.C., Wilson III D.M., Stevnsner T.V., Bohr V.A. *Mitochondrial DNA, base excision repair and neurodegeneration*. DNA Repair 7 (7): 1098-109, 2008
37. Dott W., Mistry P., Wright J., Cain K., Herbert K.E. *Modulation of mitochondrial bioenergetics in a skeletal muscle cell line model of mitochondrial toxicity*. Redox Biology 2: 224-233, 2014
38. Du L., Hickey R.W., Bayir H., Watkins S.C., Tyurin V.A., Guo F., Kochanek P.M., Jenkins L.W., Ren J., Gibson G., Chu C.T., Kagan V.E., Clark R.S.B. *Starving neurons show sex difference in autophagy*. The Journal of Biological Chemistry 284 (4): 2383-2396, 2009
39. Fatokun A.A. *Gaining notoriety through translocation: a case of the apoptosis-inducing factor (AIF) in poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)-1-dependent neuronal death*. Biokemistri 23 (3): 98-107, 2011
40. Federico A., Cardaioli E., Da Pozzo P., Formichi P., Gallus G.N., Radi E. *Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration*. Journal of the Neurological Sciences 322 (1-2): 254-262, 2012

41. Floreani M., Napoli E., Martinuzzi A., Pantano G., De Riva V., Trevisan R., Bisetto E., Valente L., Carelli V., Dabbeni-Sala F. *Antioxidant defences in cybrids harboring mtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy*. FEBS Journal 272 (5): 1124-1135, 2005
42. Fraser J.A., Biousse V., Newman N.J. *The neuro-ophthalmology of mitochondrial disease*. Survey of Ophthalmology 55 (4): 299–334, 2010
43. Fulda S. *Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer*. International Journal of Cell Biology 2010: 1-6, 2010
44. Ghelli A., Esposti M.D., Carelli V., Lenaz G. *Changes in mitochondrial complex I activity and coenzyme Q binding site in Leber's hereditary optic neuropathy (LHON)*. Molecular Aspects of Medicine 18: 263-267, 1997
45. Ghelli A., Zanna C., Porcelli A.M., Schapira A.H.V., Martinuzzi A., Carelli V., Rugolo M. *Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) pathogenic mutations induce mitochondrial-dependent apoptotic death in transmtochondrial cells incubated with galactose medium*. Journal of Biological Chemistry, 278 (6): 4145-4150, 2003
46. Ghosh S.S., Fahy E., Bodis-Wollner I., Sherman J., Howell N. *Longitudinal study of a heteroplasmic 3460 Leber hereditary optic neuropathy family by multiplexed primer-extension analysis and nucleotide sequencing*. American Journal of Human Genetics 58 (2): 325-334, 1996
47. Gilkerson R.W., De Vries R.L.A., Lebot P., Wikstrom J.D., Torgykes E., Shiriha O.S., Przedborski S., Schon E.A. *Mitochondrial autophagy in cells with mtDNA mutations results from synergistic loss of transmembrane potential and mTORC1 inhibition*. Human Molecular Genetics 21 (5): 978-990, 2012
48. Giordano C., Iommarini L., Giordano L., Maresca A., Pisano A., Valentino M.L., Caporali L., Liguori R., Deceglie S., Roberti M., Fanelli F., Fracasso F., Ross-Cisneros F.N., D'Adamo P., Hudson G., Pyle A., Yu-Wai-Man P., Chinnery P.F., Zeviani M., Salomao S.R., Berezovsky A., Belfort Jr R., Ventura D.F., Moraes M., Moraes Filho M., Barboni P., Sadun F., De Negri A., Sadun A.A., Tancredi A., Mancini M., d'Amati G., Polosa P.L., Cantatore P., Carelli V. *Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy*. Brain 137 (2): 335-253, 2014
49. Giordano C., Montopoli M., Perli E., Orlandi M., Fantin M., Ross-Cisneros F.N., Caparrotta L., Martinuzzi A., Ragazzi E., Ghelli A., Sadun A.A., d'Amati G., Carelli

- V. *Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy*. Brain 134 (1): 220-234, 2011
50. Haefeli R.H., Gemperli A.C., Robay D., Courdier Fruh I., Anklin C., Dallmann R., Gueven N. *NQO1-dependent redox cycling of idebenone: effects on cellular redox potential and energy levels*. PLoS One 6 (3): 1-12, 2011
51. Harding A.E., Riordan-Eva P., Govan G.G. *Mitochondrial DNA diseases: genotype and phenotype in Leber's hereditary optic neuropathy*. Muscle & Nerve 3: 82-84, 1995
52. He J., Cooper H.M., Di Re M., Sembongi H., Litwin T.R., Gao J., Neuman K.C., Fearnley I.M., Spinazzola A., Walker J.E., Holt I.J. *Mitochondrial nucleoid interacting proteins support mitochondrial protein synthesis*. Nucleic Acids Research 40 (13): 6109-6121, 2012
53. He J., Cooper H.M., Reyes A., Di Re M., Sembongi H., Litwin T.R., ao J., Neuman K.C., Fearnley I.M., Spinazzola A., Walker J.E., Holt I.J. *Mitochondrial nucleoid interacting proteins support mitochondrial protein synthesis*. Nucleic Acid Research 40 (13): 6109-6121, 2012
54. Hedskog L, Zhang S., Ankarcrona M. *Strategic role for mitochondria in Alzheimer's disease and cancer*. Antioxidants & Redox Signaling 16 (12): 1476-1491, 2012
55. Horan M.P., Gemmell N.J., Wolff J.N. *From evolutionary bystander to master manipulator: the emerging roles for the mitochondrial genome as a modulator of nuclear gene expression*. European Journal of Human Genetics 21 (12): 1335-1337, 2013
56. Howell N., Miller N.R., Mackey D.A., Arnold A., Herrnstadt C., Williams I.M., Kubacka I. *Lightning strikes twice: Leber hereditary optic neuropathy families with two pathogenic mtDNA mutations*. Journal of Neuroophthalmology 22 (4): 262-269, 2002
57. <http://www.lhonsociety.org>
58. <http://www.omim.org/entry/535000>
59. <http://www.mitomap.org>
60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11530/>
61. <http://www.retinareference.com/anatomy/>
62. Hudson G., Carelli V., Spruijt L., Gerards M., Mowbray C., Achilli A., Pyle A., Elson J., Howell N., La Morgia C., Valentino M.L., Huoponen K., Savontaus M.L.,



- Nikoskelainen E., Sadun A.A., Salomao S.R., Belfort Jr. R., Griffiths P., Yu-Wai-Man P., de Coo R.F.M., Horvath R., Zeviani M., Smeets H.J.T., Torroni A., Chinnery P.F. *Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background*. The American Journal of Human Genetics 81 (2): 228-233, 2007
63. Huoponen K. *Leber hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic findings*. Neurogenetics 3 (3): 119–125, 2001
64. Hüttemann M., Lee I., Samavati L., Yu H., Doan J.W. *Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling*. Biochimica et Biophysica Acta 1773 (12): 1701-1720, 2007
65. Imai Y., Moriwaki D. *A probable case of cytoplasmic inheritance in man: A critique of Leber's disease*. Journal of Genetics 33 (2): 163-167, 1936
66. Jacobs H.T. *The mitochondrial theory of aging: dead or alive?* Aging Cell 2 (1): 11-17, 2003
67. Jaeger P.A., Wyss-Coray T. *All-you-can-eat: autophagy in neurodegeneration and neuroprotection*. Molecular Neurodegeneration 4 (16): 1-22, 2009
68. Jain M.V., Paczulla A.M., Klonisch T., Dingba F.N., Rao S.B., Roberg K., Schweizer F., Lengerke C., Davoodpour P., Palicharla V.R., Maddika S., Los M. *Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development*. Journal of Cellular and Molecular Medicine 17 (1): 12-29, 2013
69. Jarrett S.G., Lin H., Godley B.F., Boulton M.E. *Mitochondrial DNA damage and its potential role in retinal degeneration*. Progress in Retinal and Eye Research 27 (6): 596-607, 2008
70. Jia X., Li S., Wang P., Guo X., Zhang Q. *mtDNA m.3635G>A may be classified as a common primary mutation for Leber hereditary optic neuropathy in the Chinese population*. Biochemical and Biophysical Research Communications 403 (2): 237–241, 2010
71. Joshi R.R. *Protein folding: interplay of hydrophobic–hydrophilic forces?* Journal of Biomolecular Structure and Dynamics 31 (9): 965-966, 2013
72. Jung C.H., Ro S.H., Cao J., Otto N.M., Kim D.H. *mTor regulation of autophagy*. FEBS Letters 584 (7): 1287-1295, 2010



73. Khan S.M., Smigrodzki R.M., Swerdlow R.H. *Cell and animal models of mtDNA biology: progress and prospects*. American Journal of Physiology - Cell Physiology 292 (2): C658-C669, 2007
74. King M.P., Attardi G. *Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation*. Science 246 (4929): 500-503, 1989
75. Kirches E. LHON: *Mitochondrial mutations and more*. Current Genomics 12 (1): 44-54, 2011
76. Kirkman M.A., Yu-Wai-Man P., Korsten A., Leonhardt M., Dimitriadis K., De Coo I.F., Klopstock T., Chinnery P.F. *Gene–environment interactions in Leber hereditary optic neuropathy*. Brain 132 (9): 2317–2326, 2009
77. Kiswa K. *Dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera*. Przegląd Okulistyczny 1, 2010
78. Klopstock T., Yu-Wai-Man P., Dimitriadis K., Rouleau J., Heck S., Bailie M., Atawan A., Chattopadhyay S., Schubert M., Garip A., Kernt M., Petraki D., Rummey C., Leinonen M., Metz G., Griffiths P.G., Meier T., Chinnery P.F. *A randomized placebo-controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy*. Brain 134 (9): 2677-2686, 2011
79. Ko H.L., Ren E.C. *Functional aspects of PARP1 in DNA repair and transcription*. Biomolecules 2 (4): 524-548, 2012
80. Kolb H. *Simple anatomy of retina*. NCBI Bookshelf: Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995-. Anatomy and Physiology of the Retina, Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]: 1-24, 2005
81. Lambert A.J., Brand M.D. *Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)*. The Journal of Biological Chemistry 279 (38): 39414-39420, 2004
82. Lang J.T., McCullough L.D. *Patways to ischemic neuronal cell death: are sex differences relevant?* Journal of Translational Medicine 6 (33): 1-10, 2008
83. Lazarou M., McKenzie M., Ohtake A., Thorburn D.R., Ryan M.T. *Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I*. Molecular and Cellular Biology 27 (12): 4228-4237, 2007
84. Lee J.A. *Autophagy in neurodegeneration: two sides of the same coin*. Biochemistry and Molecular Biology Reports 42 (6): 324-330, 2009

85. Lee J.A. *Neuronal autophagy: a housekeeper or a fighter in neuronal cell survival?* Experimental Neurobiology 21 (1): 1-8, 2012
86. Lenaz G., Baracca A., Carelli V., D'Aurelio M., Sgarbi G., Solaini G. *Bioenergetics of mitochondrial diseases associated with mtDNA mutations.* Biochimica et Biophysica Acta 1658 (1-2): 89– 94, 2004
87. Li H., Li S.H., Yu Z.X., Shelbourne P., Li X.J. *Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in huntington's disease mice.* The Journal of Neuroscience 21 (21): 8473–8481, 2001
88. Li N., Ragheb K., Lawler G., Sturgis J., Rajwa B., Melendez J.A., Robinson J.P. *Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production.* The Journal of Biological Chemistry, 278 (10): 8516-8525, 2003
89. Li Q.Y., Pedersen C., Day B., Patel M. *Dependence of excitotoxic neurodegeneration on mitochondrial aconitase inactivation.* Journal of Neurochemistry 78 (4): 746-755, 2001
90. Lin C.S., Sharpley M.S., Fan W., Waymire K.G., Sadun A.A., Carelli V., Ross-Cisneros F.N., Baciú P., Sung E., McManus M.J., Pan B.X., Gil D.W., McGregor G.R., Wallace D.C. *Mouse mtDNA mutant model of Leber hereditary optic neuropathy.* PNAS 109 (49): 20065-20070, 2012
91. Magrané J., Cortez C., Gan W.B., Manfredi G. *Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models.* Human Molecular Genetics 23 (6): 1413-1424, 2013
92. Man P.Y., Turnbull D.M., Chinnery P.F. *Leber hereditary optic neuropathy.* Journal of Medical Genetics 39 (3): 162-9, 2002
93. McIlwain D.R., Berger T., Mak T.W. *Caspase functions in cell death and disease.* Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 5 (4): 1-28 2013
94. Mimaki M., Ikota A., Sato A., Komaki H., Akanuma J., Nonaka I., Goto Y. *A double mutation (G11778A and G12192A) in mitochondrial DNA associated with Leber's hereditary optic neuropathy and cardiomyopathy.* Journal of Human Genetics 48 (1): 47-50, 2003
95. Mitchell A.L., Elson J.L., Howell N., Taylor R.W., Turnbull D.M. *Sequence variation in mitochondrial complex I genes: mutation or polymorphism?* Journal of Medical Genetics 43 (2): 175-179, 2006

96. Mookerjee S.A., Divakaruni A.S., Jastroch M., Brand M.D. *Mitochondrial uncoupling and lifespan*. Mechanism of Ageing and Development 131 (7-8): 463–472, 2010
97. Moraes C.T., Ricci E., Bonilla E., DiMauro S., Schon E.A. *The Mitochondrial tRNA<sup>LeU</sup>(UUR) mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS): genetic, biochemical, and morphological correlations in skeletal muscle*. The American Journal of Human Genetics 50 (5): 934-949, 1992
98. Nadege B., Patrick L., Rodrigue R. *Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis*. Frontiers in Bioscience 14: 4015-4034, 2009
100. Naini A.B., Lu J., Kaufmann P., Bernstein R.A., Mancuso M., Bonilla E., Hirano M., DiMauro S. *Novel mitochondrial DNA ND5 mutation in a patient with clinical features of MELAS and MERRF*. Archives of Neurology 62 (3): 473-476, 2005
101. Nakabeppu Y., Tsuchimoto D., Ichinoe A., Ohno M., Ide Y., Hirano A., Yoshimura D., Tominaga Y., Furuichi M., Sakumi K. *Biological significance of defense mechanisms against oxidative damage in nucleic acid caused by reactive oxygen species*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1011: 101-111, 2004
102. Newman N.J., Biousse V. *Hereditary optic neuropathies*. Eye 18 (11): 1144-1160, 2004
103. Nikolettou V., Papandreou M.E., Tavernarakis N. *Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system*. Cell Death and Differentiation 22 (3): 398-407, 2015
104. Nishiyama J., Miura E., Mizushima N., Watanabe M., Yuzaki M. *Aberrant membranes and double-membrane structures accumulate in the axons of Atg5-null Purkinje cells before neuronal death*. Autophagy 3 (6): 591-596, 2007
105. Osborne N.N., del Olmo-Aguado S. *Maintenance of retinal ganglion cell mitochondrial functions as a neuroprotective strategy in glaucoma*. Current Opinion in Pharmacology 13 (1): 16-22, 2013
106. Osborne N.N., Lascaratos G., Bron A.J., Chidlow G., Wood J.P.M. *A hypothesis to suggest that light is a risk factor in glaucoma and the mitochondrial optic neuropathies*. British Journal of Ophthalmology 90 (2): 237–241, 2006
107. Pätsi J., Maliniemi P., Pakanen S., Hinttala R., Uusimaa J., Majamaa K., Nyström T., Kervinen M., Hassinen I.E. *LHON/MELAS overlap mutation in ND1 subunit of mitochondrial complex I affects ubiquinone binding as revealed by modeling in Escherichia coli NDH-1*. Biochimica et Biophysica Acta 1817 (2): 312–318, 2012

108. Polewska J. *Autofagia – mechanizm molekularny, apoptoza i nowotwory*. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 66: 921-936, 2012
109. Ramalho R.M., Viana R.J.S., Low W.C., Steer C.J., Rodrigues C.M.P. *Bile acids and apoptosis modulation: an emerging role in experimental Alzheimer's disease*. Trends in Molecular Medicine 14 (2): 54-62, 2008
110. Ramanujan K.V. *Metabolic Switch: A Phenotype or a Phenomenon?* Journal of Cell Science & Therapy 5 (2): 1-3, 2014
111. Reichert A.S., Neupert W. *Mitochondriomics or what make us breathe*. Trends in Genetics 20 (11): 555-562, 2004
112. Rodriguez-Muela N., Germain F., Mariño G., Fitze P.S., Boya P. *Autophagy promotes survival of retinal ganglion cells after optic nerve axotomy in mice*. Cell Death and Differentiation 19 (1): 162-169, 2011
113. Rosello A., Warnes G., Meier U.C. *Cell death pathways and autophagy in the central nervous system and its involvement in neurodegeneration, immunity and central nervous system infection: to die or not to die – that is the question*. Clinical and Experimental Immunology, 168 (1): 52–57, 2011
114. Rugarli E., Langer T. *Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons*. The EMBO Journal 31 (6): 1336- 1349, 2012
115. Sadun A.A., La Morgia C., Carelli V. *Leber's Hereditary Optic Neuropathy*. Current Treatment options in Neurology 13 (1): 109-117, 2011
116. Sahani M.H., Itakura E., Mizushima N. *Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids*. Autophagy 10 (3): 431-441, 2014
117. Schapira A.H.V. *Mitochondrial disease*. Lancet 368 (9529): 70-82, 2006
118. Schapira A.H.V. *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. Cell Death and Differentiation 14 (7): 1261–1266, 2007
119. Schon E.A., DiMauro S., Hirano M. *Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations*. Nature Reviews Genetics 13 (12): 878-890, 2012
120. Schon E.A., Manfredi G. *Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction*. The Journal of Clinical Investigation 111 (3): 303-312 2003
121. Sen C.K., Packer L. *Methods in enzymology. Redox Cell Biology and Genetics*. Elsevier Science 352 (13): 150-153: 2002

122. Shankar S.P., Fingert J.H., Carelli V., Valentino M.L., King T.M., Daiger S.P., Salomao S.R., Berezovsky A., Belfort R. Jr., Braun T.A., Sheffield V.C., Sadun A.A., Stone E.M. *Evidence for a novel X-linked modifier locus for Leber hereditary optic neuropathy*. Ophthalmic Genetics 29 (1): 17-24, 2008
123. Sharma H., Singh A., Sharma C., Jain S. K., Singh N. *Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region are frequent in cervical cancer*. Cancer Cell International 5 (34): 1-6, 2005
124. Shchepina L.A., Pletjushkina O.Y., Avetisyan A.V., Bakeeva L.E., Fetisova E.K., Izyumov D.S, Saprunova V.B., Vyssokikh M.Y., Chernyak B.V., Skulachev V.P. *Oligomycin, inhibitor of the  $F_0$  part of  $H^+$ -ATP-synthase, suppresses the TNF-induced apoptosis*. Oncogene 21 (53): 8149-8157, 2002
125. Smits P., Smeitink J., van den Heuvel L. *Mitochondrial translation and beyond: process implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010: 1-24, 2010
126. Spelbrink J.N. *Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges*. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life 62 (1): 19-32, 2010
127. Swerdlow R.H. *Mitochondria in cybrids containing mtDNA from persons with mitochondriopathies*. Journal of Neuroscience Research 85 (15): 3416–3428, 2007
128. Tońska K., Kurzawa M., Ambroziak A., Korwin-Rujna M., Szaflik J.P., Grabowska E., Szaflik J., Bartnik E. *A family with 3460G>A and 11778G>A mutations and haplogroup analysis of Polish Leber hereditary optic neuropathy patients*. Mitochondrion 8 (5-6): 383-388 , 2008
129. Torroni A., Petrozzi M., D'Urbano L., Sellitto D., Zeviani M., Carrara F., Carducci C., Leuzzi V., Carelli V., Barboni P., De Negri A., Scozzari R. *Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484*. American Journal of Human Genetics 60 (5): 1107-1121, 1997
130. Tuppen H.A.L., Blakely E.L., Turnbull D.M., Taylor R.W. *Mitochondrial DNA mutations and human disease*. Biochimica et Biophysica Acta 1797 (2): 113-128, 2010

131. Ueno H., Miyoshi H., Ebisui K., Iwamura H. *Comparison of the inhibitory action of natural rotenone and its stereoisomers with various NADH-ubiquinone reductases.* European Journal of Biochemistry 225 (1): 411-417, 1994
132. Valentino M.L., Barboni P., Rengo C., Achilli A., Torroni A., Lodi R., Tonon C., Barbiroli B., Fortuna F., Montagna P., Baruzzi A., Carelli V. *The 13042G>A/ND5 mutation in mtDNA is pathogenic and can be associated also with a prevalent ocular phenotype.* Journal of Medical Genetics 43 (7): 1-6, 2006
133. Vorwerk C.K., Lipton S.A., Zurakowski D., Hyman B.T., Sabel B.A., Dreyer E.B. *Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine.* Investigative Ophthalmology & Visual Science 37 (8): 1618-24, 1996
134. Wahlsten J.L., Gitchell H.L., Chan C.C., Wiggert B., Caspi R.R. *Fas and Fas ligand expressed on cells of the immune system, not on the target tissue, control induction of experimental autoimmune uveitis.* The Journal of Immunology 165 (10): 5480-5486, 2000
135. Wallace D.C., Chalkia D. *Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease.* Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 5 (11): 1-49, 2013
136. Wallace D.C., Singh G., Lott M.T., Hodge J.A., Schurr T.G., Lezza A.M., Elsas L.J., Nikoskelainen E.K. *Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy.* Science 242 (4884): 1427-1430, 1988
137. Wallis Y., Payne S., McAnulty C., Bodmer D., Sistermans E., Robertson K., Moore D., Abbs S., Deans Z., Devereau A. *Practice guidelines for the evaluation of pathogenicity and the reporting of sequence variants in clinical molecular genetics.* Association for Clinical Genetic Science, 1-16, 2013
138. Wang J.T., Merdres Z.A., Barres B.A. *Axon degeneration: Molecular mechanisms of a self-destruction pathway.* The Journal of Cell Biology 196 (1): 7-18, 2012
139. Wang Q.J., Ding Y., Kohtz S., Mizushima N., Cristea I.M., Rout M.P., Chait B.T., Zhong, Y., Heintz N., Yue Z. *Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration.* The Journal of Neuroscience 26 (31): 8057-8068, 2006
140. Wei Q.P., Zhou X., Yang L., Sun Y.H., Zhou J., Li G., Jiang R., Lu R., Qu J., Guan M.X. *The coexistence of mitochondrial ND6 T14484C and 12S rRNA A1555G mutations in a Chinese family with Leber's hereditary optic neuropathy and hearing loss.* Biochemical and Biophysical Research Communications 357 (4): 910-916, 2007



141. Wilkins H.M., Carl S.M., Swerdlow R.H. *Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondriopathies*. Redox Biology 2 (2014): 619–631, 2014
142. Wong A., Cavelier L., Collins-Schramm H.E., Seldin M.F., McGrogan M., Savontaus M.L., Cortopasso G.A. *Differentiation-specific effects of LHON mutations introduced into neuronal NT2 cells*. Human Molecular Genetics 11 (4): 431–438, 2002
143. Yang J., Zhu Y., Tong Y., Chen L., Liu L., Zhang Z., Wang X. *Confirmation of the mitochondrial ND1 gene mutation G3635A as a primary LHON mutation*. Biochemical and Biophysical Research Communications 386 (1): 50–54, 2009
144. Yang J.-L., Weissman L., Bohr V.A., Mattson M.P. *Mitochondrial DNA damage and repair in neurodegenerative disorders*. DNA Repair 7 (7): 1110–1120, 2008
145. Ye H., Cande C., Stephanou N.C., Jiang S., Gurbuxani S., Larochette N., Daugas E., Garrido C., Kroemer G., Wu H. *DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor*. Nature Structural & Molecular Biology 9 (9): 680 – 684, 2002
146. Yu H., Ozdemir S.S., Koilkonda R.D., Chou T.H., Porciatti V., Chiodo V., Boye S.L., Hauswirth W.W., Lewin A.S., Guy J. *Mutant NADH dehydrogenase subunit 4 gene delivery to mitochondria by targeting sequence-modified adeno-associated virus induces visual loss and optic atrophy in mice*. Molecular Vision 18: 1668–1683, 2012
147. Yu L., Strandberg L., Lenardo M.J. *The selectivity of autophagy and its role in cell death and survival*. Autophagy 4 (5): 567–573, 2008
148. Yu S.W., Wang Y., Frydenlund D.S., Ottersen O.P., Dawson V.L., Dawson T.M. *Outer mitochondrial membrane localization of apoptosis-inducing factor: mechanistic implications for release*. The American Society for Neurochemistry 1 (5): 275–281, 2009
149. Yu S.W., Wang Y., Poitras M.F., Coombs C., Bowers W.J., Federoff H.J., Poirier G.G., Dawson T.M., Dawson V.L. *Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor*. Science 297(5579): 259–263, 2002



150. Yu-Wai-Man P., Griffiths P.G., Brown D.T., Howell N., Turnbull D.M., Chinnery P.F. *The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England*. The American Journal of Human Genetics 72 (2): 333–339, 2003
151. Yu-Wai-Man P., Griffiths P.G., Chinnery P.F. *Mitochondrial optic neuropathies – Disease mechanisms and therapeutic strategies*. Progress in Retinal and Eye Research 30 (2-2): 81–114, 2011
152. Zanna C., Ghelli A., Porcelli A.M., Martinuzzi A., Carelli V., Rugolo M. *Caspase-independent death of Leber's hereditary optic neuropathy cybrids is driven by energetic failure and mediated by AIF and Endonuclease G*. Apoptosis 10 (5): 997–1007, 2005
153. Zanna C., Ghelli A., Porcelli A.M., Carelli V., Martinuzzi A., Rugolo M. *Apoptotic cell death of cybrids cells bearing Leber's Hereditary Optic Neuropathy mutations is caspase independent*. Annals New York Academy of Science 1010 (1): 213–217, 2003
154. Zhang A.M., Zou Y., Guo X., Jia X., Zhang Q., Yao Y.G. *Mitochondrial DNA mutation m.3635G>A may be associated with Leber hereditary optic neuropathy in Chinese*. Biochemical and Biophysical Research Communications 386 (2): 392–395, 2009
155. Zhang A.M., Jia X., Bi R., Salas A., Li S., Xiao X., Wang P., Guo X., Kong Q.P., Zhang Q., Yao Y.G. *Mitochondrial DNA haplogroup background affects LHON, but not suspected LHON, in Chinese patients*. PLoS One 6 (11): 1-10, 2011

## Suplement 1

**Tabela 25. Charakterystyka starterów użytych do amplifikacji genomu mitochondrialnego.** Startery na końcach 5' zawierają dodatkowo 18 nukleotydową sekwencję faga M13; sekwencja FM13 dla startera F 5'TGTAAAACGACGGCCAGT3'; sekwencja FM13 dla startera R 5'CAGGAAACAGCTATGACC3'. Starter F (ang. forward), a starter R (ang. reverse).

oznaczenie startera	sekwencja startera 5' - 3'	pozycja przyłączania startera w mtDNA
FM13-1F FM13-1R	CACACACACCACTGCTAAC GATATGAAGCACCGCCAGG	516-534 1190-1172
FM13-2F FM13-2R	GAACACTACGAGCCACAGC TCATCTTTCCTTGCGGTAC	1138-1156 1801-1782
FM13-3F FM13-3R	AATTGAAACCTGGCGCAATAG TGAGCATGCCTGTGTTGGG	1766-1776 2444-2426
FM13-4F FM13-4R	ACCAACAAGTCATTATTACCC TGAAGTCAGATCACGTAGGAC	2395-2415 3074-3054
FM13-5F FM13-5R	GGATCAGGACATCCCGATG AACGGCTAGGCTAGAGGTG	2995-3013 3645-3627
FM13-6F FM13-6R	TAGCTCTCACCATCGCTC GATTGTAATGGGTATGGAGAC	3536-3553 4239-4219
FM13-7F FM13-7R	TCCTACCACTCACCTAGC GTCATGTGAGAAGAAGCA	4184-4202 4869-4850
FM13-8F FM13-8R	CACCCCTCTGACATCCGG AGTATTGCAACTTACTGAGG	4832-4849 5570-5551
FM13-9F FM13-9R	AATACAGACCAAGAGCCTTC GGGAAACGCCATATCGGG	5526-5545 6188-6171
FM13-10F FM13-10R	TACCCATCSTAATCGGAGGC AATATATGGTGTGCTCACACG	6115-6134 6781-6761
FM13-11F FM13-11R	CTATGATATCAATTGGCTTCC GGCATCCATATAGTCACTCC	6730-5750 7398-7379

## Suplement 1

Tabela 25 c.d.

oznaczenie startera	sekwencja startera 5' - 3'	pozycja przyłączenia startera w mtDNA
FM13-12F FM13-12R	CCTAATAGTAGAAGAACCCTC CTCGATTGTCAACGTCAAGG	7349-7369 8009-7990
FM13-13F FM13-13R	ATTATTCCTAGAACCAGGCG TGATGAGATATTTGGAGGTGG	7960-7979 8641-8621
FM13-14F FM13-14R	ACAATCCTAGGCCTACCCG GATAGGCATGTGATTGGTGG	8563-8581 9231-9212
FM13-15F FM13-15R	AGCCTCTACCTGCACGAC GGATGAAGCAGATAGTGAGG	9181-9198 9867-9848
FM13-16F FM13-16R	ACTTCACGTCATTATTGGCTC AGTGAGATGGTAAATGCTAG	9821-9811 10516-10497
FM13-17F FM13-17R	CTGAACCGAATTGGTATATAG TCGTGATAGTGGTTCACCTGG	10394-10414 11032-11013
FM13-18F FM13-18R	ACAATCATGGCAAGCCAACG TTATGAGAATGACTGCGCCG	10985-11004 11708-11689
FM13-19F FM13-19R	AGCCACATAGCCCTCGTAG TGGTTATAGTAGTGTGCATGG	11633-11651 12361-12341
FM13-20F FM13-20R	CTATCCATTGGTCTTAGGC TTTGCCCTGCTGCTGCTAGG	12284-12302 13005-12987
FM13-21F FM13-21R	CGCTAATCCAAGCCTCACC TATTCGAGTGCTATAGGCGC	12951-12969 13614-13595
FM13-22F FM13-22R	TTACTCTCATCGCTACCTCC GGTTGATTCTGGGAGGATCC	13568-13587 14276-14258
FM13-23F FM13-23R	CCCATAATCATACAAAGCCC GTTGAGGCGTCTGGTGAG	14227-14246 14928-14911

**Suplement 1** Tabela 25 c.d.

oznaczenie startera	sekwencja startera 5' - 3'	pozycja przyłączania startera w mtDNA
FM13-24F FM13-24R	ACTACAAGAACACCAATGACC TGTAGTAAGGGTGGAAGGTG	14732-14752 15419-15400
FM13-25F FM13-25R	TAGGAATCACCTCCCATTCC GTCAATACTTGGGTGGTACC	15372-15391 16067-16048
FM13-D1F FM13-D1R	AATGGGCCTGTCCTTGTAG AACGTGTGGGCTATTTAGGC	15879-15897 16545-16526
FM13-D2F FM13-D2R	CGACATCTGGTTCCTACTTC GGGTTTGGTTGGTCCGGG	16495-16514 559-542
FM13-D3F FM13-D3R	CGCTTCTGGCCACAGCAC GGTGTGGCTAGGCTAAGC	315-332 803-786

## Suplement 2

**Tabela 26. Wyniki analizy profilu jądrowego 3 loci STR dla DNA wyizolowanego z linii komórkowych fibroblastów i cybryd pacjentów i osób z grupy kontrolnej oraz komórek rho0 143B.** Numer allelu jest odpowiednikiem liczby powtórzeń danego motywu w konkretnym locus. W tabeli umieszczono długości sekwencji alleli i numery poszczególnych alleli dla każdego z loci. p. – pacjenci z LHON, k.- kontrole; kropka w numerze allelu oznacza, że dany motyw powtarzalny w locus został powtórzony niepełną ilość razy (np. allel 9.3 dla locus TH01 oznacza, że motyw AATG został powtórzony 9 razy oraz trzy kolejne nukleotydy z motywu - [AATG]<sub>6</sub>ATG[AATG]<sub>3</sub>)

	Długość sekwencji (pz)	Allel	Długość sekwencji allelu (pz)	Allel	Długość sekwencji allelu (pz)	Allel
<b>p.1</b>	<b>FIBROBLASTY</b>		<b>CYBRYDY</b>		<b>rho0 143B</b>	
<b>TH01</b>	69	<b>6</b>	77	<b>8</b>	77	<b>8</b>
	81	<b>9</b>	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>
<b>D21S11</b>	200	<b>36</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
	214	<b>39.1</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
<b>CSF1PO</b>	108	<b>12.1</b>	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>
	114	<b>14</b>	109	<b>12.3</b>	109	<b>12.3</b>
<b>p.3</b>	<b>FIBROBLASTY</b>		<b>CYBRYDY</b>		<b>rho0 143B</b>	
<b>TH01</b>	81	<b>9</b>	77	<b>8</b>	77	<b>8</b>
	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>
<b>D21S11</b>	167	<b>27.2</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
	155	<b>24.2</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
<b>CSF1PO</b>	105	<b>11.2</b>	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>
	109	<b>12.3</b>	109	<b>12.3</b>	109	<b>12.3</b>
<b>p.4</b>	<b>FIBROBLASTY</b>		<b>CYBRYDY</b>		<b>rho0 143B</b>	
<b>TH01</b>	69	<b>6</b>	77	<b>8</b>	69	<b>6</b>
	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>
<b>D21S11</b>	167	<b>27</b>	171	<b>28.2</b>	167	<b>27</b>
	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
<b>CSF1PO</b>	105	<b>11.2</b>	101	<b>10.3</b>	105	<b>11.2</b>
	109	<b>12.3</b>	109	<b>12.3</b>	109	<b>12.3</b>
<b>p.5</b>	<b>FIBROBLASTY</b>		<b>CYBRYDY</b>		<b>rho0 143B</b>	
<b>TH01</b>	81	<b>9</b>	77	<b>8</b>	77	<b>8</b>
	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>
<b>D21S11</b>	167	<b>27</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
	175	<b>29.2</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
<b>CSF1PO</b>	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>
	81	<b>9</b>	77	<b>8</b>	77	<b>8</b>

## Suplement 2 Tabela 26. c.d.

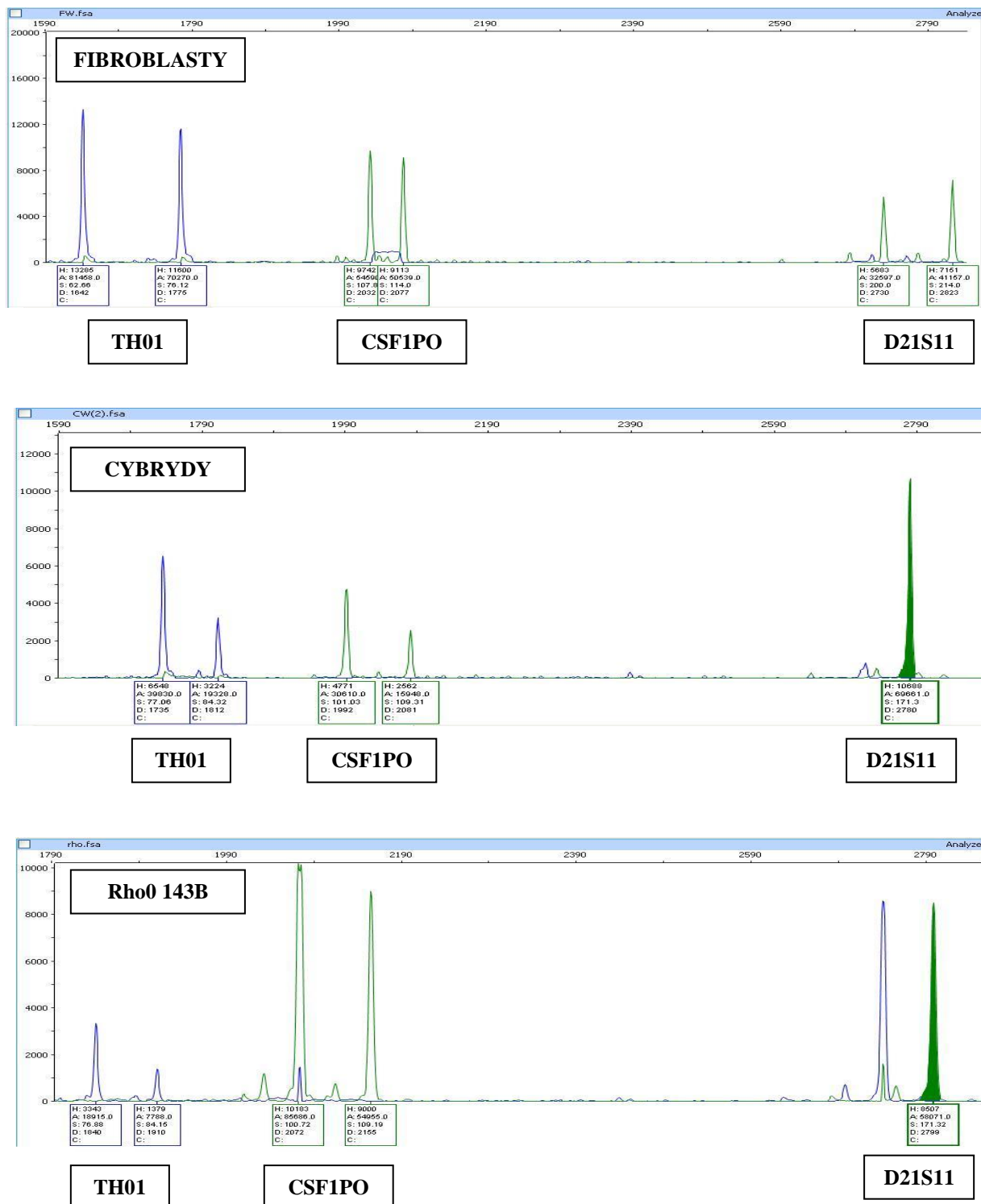
	Długość sekwencji (pz)	Allel	Długość sekwencji allelu (pz)	Allel	Długość sekwencji allelu (pz)	Allel
<b>p.6</b>	<b>FIBROBLASTY</b>		<b>CYBRYDY</b>		<b>rho0 143B</b>	
TH01	69	<b>6</b>	77	<b>8</b>	77	<b>8</b>
	81	<b>9</b>	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>
D21S11	168	<b>27.3</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
	175	<b>29.2</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
CSF1PO	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>
	105	<b>11.2</b>	109	<b>12.3</b>	109	<b>12.3</b>
<b>p.7</b>	<b>FIBROBLASTY</b>		<b>CYBRYDY</b>		<b>rho0 143B</b>	
TH01	81	<b>9</b>	77	<b>8</b>	77	<b>8</b>
	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>
D21S11	167	<b>27.2</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
	175	<b>29.2</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
CSF1PO	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>
	109	<b>12.3</b>	109	<b>12.3</b>	109	<b>12.3</b>
<b>ck.1</b>	<b>FIBROBLASTY</b>		<b>CYBRYDY</b>		<b>rho0 143B</b>	
TH01	69	<b>6</b>	77	<b>8</b>	77	<b>8</b>
	77	<b>8</b>	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>
D21S11	186	<b>32</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
	186	<b>32</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
CSF1PO	105	<b>11.2</b>	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>
	109	<b>12.3</b>	109	<b>12.3</b>	109	<b>12.3</b>
<b>ck.2</b>	<b>FIBROBLASTY</b>		<b>CYBRYDY</b>		<b>rho0 143B</b>	
TH01	81	<b>9</b>	77	<b>8</b>	77	<b>8</b>
	81	<b>9</b>	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>
D21S11	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
CSF1PO	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>
	105	<b>11.2</b>	109	<b>12.3</b>	109	<b>12.3</b>
<b>ck.3</b>	<b>FIBROBLASTY</b>		<b>CYBRYDY</b>		<b>rho0 143B</b>	
TH01	84	<b>9.3</b>	77	<b>8</b>	77	<b>8</b>
	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>
D21S11	167	<b>27.2</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
	175	<b>29.2</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
CSF1PO	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>
	109	<b>12.3</b>	109	<b>12.3</b>	109	<b>12.3</b>

## Suplement 2 Tabela 26. c.d.

	Długość sekwencji (pz)	Allel	Długość sekwencji allelu (pz)	Allel	Długość sekwencji allelu (pz)	Allel
<b>ck.4</b>	<b>FIBROBLASTY</b>		<b>CYBRYDY</b>		<b>rho0 143B</b>	
<b>TH01</b>	69	<b>6</b>	77	<b>8</b>	77	<b>8</b>
	77	<b>8</b>	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>
<b>D21S11</b>	174	<b>29</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
	186	<b>32</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
<b>CSF1PO</b>	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>
	109	<b>12.3</b>	109	<b>12.3</b>	109	<b>12.3</b>
<b>ck.5</b>	<b>FIBROBLASTY</b>		<b>CYBRYDY</b>		<b>rho0 143B</b>	
<b>TH01</b>	69	<b>6</b>	77	<b>8</b>	77	<b>8</b>
	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>
<b>D21S11</b>	167	<b>27.2</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
	186	<b>32</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
<b>CSF1PO</b>	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>
	109	<b>12.3</b>	109	<b>12.3</b>	109	<b>12.3</b>
<b>ck.6</b>	<b>FIBROBLASTY</b>		<b>CYBRYDY</b>		<b>rho0 143B</b>	
<b>TH01</b>	69	<b>6</b>	77	<b>8</b>	77	<b>8</b>
	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>	84	<b>9.3</b>
<b>D21S11</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
	190	<b>33</b>	171	<b>28.2</b>	171	<b>28.2</b>
<b>CSF1PO</b>	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>	101	<b>10.3</b>
	105	<b>11.2</b>	109	<b>12.3</b>	109	<b>12.3</b>



## Suplement 2



Rysunek 44. Przykładowe elektroforegramy dla trzech markerów jądrowych systemu STR (TH01, CSF1PO, D21S11) określonych dla DNA wyizolowanego z cybryd i fibroblastów pacjenta p.1 oraz komórek rho0 143B. Odczyt przeprowadzono w programie Peak Scanner 1.0. Wypełnione piki są homozygotyczne w danym markerze.

## Suplement 3

Linie komórkowe limfoblastów

**Tabela 27. Wyniki analizy testu t Studenta.** W teście oceniono istotność statystyczną różnic w wynikach szybkości zużycia tlenu na różnych etapach analizy między limfoblastami z mutacjami LHON a limfoblastami kontrolnymi oraz w wynikach oddychania w warunkach podstawowych między komórkami z jedną i dwiema mutacjami LHON. Wartość  $p < 0,05$  oznacza, że różnica jest istotna statystycznie. Wartości istotne statystycznie zaznaczono w tabeli na żółto.

linia komórkowa	etap analizy	wynik testu t Studenta
1 MUT	warunki podstawowe	t=0,87, p=0,45
	pirogrońian + glutaminian	t=0,94, p=0,42
	oligomycyna	t=1,31, p=0,28
	cccp	t=0,59, p=0,59
p.1	warunki podstawowe	t=4,10, p=0,06
	pirogrońian + glutaminian	t=2,16, p=0,16
	oligomycyna	t=1,59, p=0,25
	cccp	t=5,64, p=0,03
p.3	warunki podstawowe	t=2,44, p=0,14
	pirogrońian + glutaminian	t=1,14, p=0,37
	oligomycyna	t=1,10, p=0,39
	cccp	t=3,33, p=0,08
p.5	warunki podstawowe	t=2,20, p=0,09
	pirogrońian + glutaminian	t=1,28, p=0,27
	oligomycyna	t=2,74, p=0,05
	cccp	t=1,13, p=0,32
p.6	warunki podstawowe	t=0,96, p=0,41
	pirogrońian + glutaminian	t=2,78, p=0,07
	oligomycyna	t=1,93, p=0,15
	cccp	t=3,14, p=0,05
1MUT vs 2 mutacje		
1MUT/p.1	warunki podstawowe	t=1,92, p=0,15
1MUT/p.3		t=0,78, p=0,49
1MUT/p.5		t=0,70, p=0,51
1MUT/p.6		t=0,63, p=0,56

## Suplement 3

**Tabela 28. Wyniki analiz testu t Studenta.** W teście oceniono istotność statystyczną różnic w wynikach wydolności oddechowej między limfoblastami z mutacjami LHON a limfoblastami kontrolnymi. Wartość  $p < 0,05$  oznacza, że różnica jest istotna statystycznie. Wartości istotne statystycznie zaznaczono w tabeli na żółto.

linia komórkowa	wartość testu t Studenta, wartość p
1 MUT	t=1,12, p=0,35
p.1	t=0,10, p=0,93
p.3	t=1,64, p=0,24
p.5	t=0,63, p=0,57
p.6	t=1,23, p=0,31

## Suplement 3

Linie komórkowe fibroblastów

**Tabela 29. Wyniki analiz testu t Studenta.** W teście oceniono istotność statystyczną różnic w wynikach szybkości zużycia tlenu na różnych etapach analizy między fibroblastami z mutacjami LHON a fibroblastami kontrolnymi. Wartość  $p < 0,05$  oznacza, że różnica jest istotna statystycznie. Wartości istotne statystycznie zaznaczono w tabeli na żółto.

linia komórkowa	etap analizy	wartość testu t Studenta, wartość p
p.1	warunki podstawowe	t=7,79, p=0,001
	pirogronian + glutaminian	t=6,88, p=0,001
	oligomycyna	t=6,99, p=0,001
	cccp	t=6,56, p=0,001
p.5	warunki podstawowe	t=0,66, p=0,55
	pirogronian + glutaminian	t=0,41, p=0,71
	oligomycyna	t=0,95, p=0,40
	cccp	t=1,47, p=0,22
p.6	warunki podstawowe	t=4,12, p=0,015
	pirogronian + glutaminian	t=5,47, p=0,006
	oligomycyna	t=,92, p=0,008
	cccp	t=4,80, p=0,009
p.7	warunki podstawowe	t=24,78, p=0,0001
	pirogronian + glutaminian	t=28,94, p=0,0001
	oligomycyna	t=9,54, p=0,0007
	cccp	t=24, 98, p=0,0001

**Tabela 30. Wyniki analiz testu t Studenta.** W teście oceniono istotność statystyczną różnic w wynikach wydolności oddechowej między fibroblastami z mutacjami LHON a fibroblastami kontrolnymi. Wartość  $p < 0,05$  oznacza, że różnica jest istotna statystycznie.

linia komórkowa	wartość testu t Studenta, wartość p
p.1	t=1,25, p=0,27
p.5	t=1,40, p=0,24
p.6	t=1,18, p=0,30
p.7	t=0,43, p=0,69

## Suplement 3

### Linie komórkowe cybryd

**Tabela 31. Wyniki analiz testu t Studenta.** W teście oceniono istotność statystyczną różnic w wynikach szybkości zużycia tlenu na różnych etapach analizy między cybrydami z mutacjami LHON a komórkami kontrolnymi. Wartość  $p < 0,05$  oznacza, że różnica jest istotna statystycznie. Wartości istotne statystycznie zaznaczono w tabeli na żółto.

linia komórkowa	etap analizy	wartość testu t Studenta, wartość p
p.1	warunki podstawowe	t=34,1, p=0,0001
	pirogronian + glutaminian	t=159, p=0,0001
	oligomycyna	t=16,9, p=0,001
	cccp	t=106, p=0,0001
p.6	warunki podstawowe	t=11,6, p=0,001
	pirogronian + glutaminian	t=14,8, p=0,001
	oligomycyna	t=0,45, p=0,70
	cccp	t=6,81, p=0,01
p.7	warunki podstawowe	t=4,43, p=0,012
	pirogronian + glutaminian	t=5,67, p=0,005
	oligomycyna	t=8,29, p=0,001
	cccp	t=5,57, p=0,005

**Tabela 32. Wyniki analiz testu t Studenta.** W teście oceniono istotność statystyczną różnic w wynikach wydolności oddechowej między cybrydami z mutacjami LHON a cybrydami kontrolnymi. Wartość  $p < 0,05$  oznacza, że różnica jest istotna statystycznie. Wartości istotne statystycznie zaznaczono w tabeli na żółto.

linia komórkowa	wartość testu t Studenta, wartość p
p.1	t=8,16, p=0,004
p.6	t=6,4, p=0,008
p.7	t=2,10, p=0,10

## Suplement 4

**Tabela 33. Wyniki analizy statystycznej.** W teście testu t Studenta dla prób zależnych oceniono istotność statystyczną różnic w wynikach liczby wolnych nukleosomów i aktywności kaspaz 3 i 7 między komórkami limfoblastów, fibroblastów i cybryd hodowanych w pożywce z glukozą względem hodowli z 5mM galaktozą lub z 2,5μM rotenonem. Wartość  $p < 0,05$  oznacza, że różnica jest istotna statystycznie. Wartości istotne statystycznie zaznaczono w tabeli na żółto.

	wynik testu t Studenta hodowla komórek z glukozą vs. 5mM galaktozą		wynik testu t Studenta hodowla komórek z glukozą vs. 2,5μM rotenonem	
	liczba wolnych nukleosomów	aktywność kaspaz 3 i 7	liczba wolnych nukleosomów	aktywność kaspaz 3 i 7
<b>LIMFOBLASTY</b>				
p.1	t=0,58, p=0,62	t=4,66, p=0,04	t=0,27, p=0,82	t=5,70, p=0,01
p.3	t=0,34, p=0,77	t=5,32, p=0,01	t=1,89, p=0,20	t=0,50, p=0,71
p.5	t=35, p=0,02	t=10,97, p=0,06	t=4,64, p=0,04	t=32,34, p=0,02
p.6	t=0,43, p=0,71	t=2,27, p=0,26	t=6,20, p=0,03	t=2,92, p=0,21
p.7	t=0,07, p=0,95	t=3,48, p=0,04	t=2,10, p=0,17	t=1,04, p=0,41
1MUT	t=5,67, p=0,03	t=4,91, p=0,04	t=2,72, p=0,11	t=0,44, p=0,70
kontrole	t=0,10, p=0,93	t=2,05, p=0,11	t=2,25, p=0,09	t=0,65, p=0,55
<b>FIBROBLASTY</b>				
p.1	t=0,30, p=0,80	t=1,00, p=0,42	t=3,01, p=0,09	t=2,73, p=0,11
p.3	t=0,15, p=0,90	t=3,55, p=0,18	t=3,32, p=0,08	t=0,64, p=0,59
p.4	t=0,38, p=0,74	t=3,43, p=0,08	t=1,15, p=0,37	t=0,92, p=0,46
p.5	t=0,95, p=0,44	t=2,77, p=0,22	t=2,50, p=0,13	t=0,46, p=0,69
p.6	t=1,05, p=0,40	t=0,37, p=0,78	t=3,30, p=0,08	t=0,82, p=0,56
p.7	t=1,10, p=0,47	t=1,79, p=0,22	t=1,31, p=0,32	t=1,38, p=0,30
kontrole	t=0,78, p=0,47	t=1,78, p=0,14	t=1,84, p=0,13	t=1,78, p=0,14

**Suplement 4.** Tabela 33. c.d.

linia komórkowa	wynik testu t Studenta		wynik testu t Studenta	
	hodowla komórek z glukozą vs. 5mM galaktozą		hodowla komórek z glukozą vs. 2,5μM rotenonem	
CYBRYDY	liczba wolnych nukleosomów	aktywność kaspaz 3 i 7	liczba wolnych nukleosomów	aktywność kaspaz 3 i 7
p.1	t=1,70, p=0,23	t=3,10, p=0,20	t=3,25, p=0,08	t=5,73, p=0,11
p.3	t=5,56, p=0,03	t=14,44, p=0,005	t=8,17, p=0,02	t=9,08, p=0,07
p.4	t=6,58, p=0,02	t=150,7, p=0,004	t=1,39, p=0,30	t=1,95, p=0,30
p.5	t=1,88, p=0,20	t=4,78, p=0,13	t=0,19, p=0,87	t=1,39, p=0,40
p.6	t=1,14, p=0,37	t=5,50, p=0,03	t=4,67, p=0,04	t=18,71, p=0,003
p.7	t=6,06, p=0,03	t=10,74, p=0,009	t=2,32, p=0,15	t=1,98, p=0,30
kontrole	T=1,69, p=0,17	T=0,47, p=0,66	T=1,40, p=0,24	T=1,29, p=0,27